

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Fyziologie živočichů

Bc. Zuzana Papáčková

Mechanismy podmiňující rozvoj inzulinové rezistence při jaterní steatóze

**Mechanisms underlying the development of insulin
resistance in liver steatosis**



Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Monika Cahová, PhD.

Praha 2011

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 4. 2011

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala své školitelce RNDr. Monice Cahové, PhD. za její odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady při psaní této diplomové práce.

Velký dík patří i kolegům z laboratoře za podporu a příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

V předkládané práci jsme se zaměřili na identifikaci hlavních enzymů zodpovědných za štěpení zásobních triacylglycerolů (TAG) v játrech. Dále jsme testovali hypotézu, zda akumulace TAG v játrech indukovaná krátkodobým podáváním vysokotukové diety (VTD) vede u potkanů ke změnám v regulaci degradace intracelulárních TAG v játrech a zda je kauzálně spojena se vznikem jaterní inzulínové rezistence.

Lysozomální lipáza (LAL) byla jedinou testovanou lipázou, která byla schopna štěpit intracelulární TAG. Prokázali jsme výskyt tohoto enzymu ve dvou kvalitativně odlišných frakcích (lehká a těžká lysozomální frakce). Na rozdíl od LAL asociované s těžkými lysozomy, LAL lokalizovaná v lehké lysozomální frakci vykazovala změny v závislosti na hladovění nebo dietní intervenci. U potkanů na standardní dietě (SD), byla aktivita LAL v této frakci zvýšená při hladovění a významně potlačená v sytém stavu. Ve skupině krmené vysokotukovou dietou jsme prokázali zvýšený obsah TAG, zvýšenou aktivitu LAL v sytém stavu, zvýšenou produkci DAG a vymizení regulace aktivity LAL závislé na hladovění v lehké lysozomální frakci. V játrech potkanů krmených VTD jsme dále prokázali zhoršení přenosu inzulínového signálu a zvýšenou aktivaci PKC ϵ .

Z těchto výsledků vyvozujeme, že nadprodukce diacylglycerolu lysozomální lipázou a následná aktivace PKC ϵ může představovat kauzální spojení mezi akumulací TAG v játrech a jaterní inzulínovou rezistencí.

Klíčová slova: inzulínová rezistence, nealkoholická jaterní steatóza, kyselá lysozomální lipáza, proteinkináza C ϵ

Abstract

We tested the hypothesis that triacylglycerol (TAG) accumulation in the liver induced by short-term high-fat diet (HFD) in rats leads to the dysregulation of endogenous TAG degradation via lysosomal pathway and is causally linked with the development of hepatic insulin resistance.

Lysosomal lipase (LAL) is stored in qualitatively different depots (light and dense lysosomes). In contrast to dense lysosomal fraction, LAL associated with light lysosomes exhibits high activity on intracellular TAG and prandial- or diet-dependent regulation. On standard diet, LAL activity was up-regulated in starved and down-regulated in fed animals. In the HFD group, we demonstrated elevated LAL activity, increased TAG content, enhanced production of diacylglycerol and the abolishment of prandial-dependent LAL regulation in light lysosomal fraction. The impairment of insulin signalling and increased activation of PKC ϵ was found in liver of HFD-fed animals.

Lipolysis of intracellular TAG, mediated by LAL, is increased in steatosis probably due to the enhanced formation of phagolysosomes. Consequent overproduction of diacylglycerol may represent the causal link between HFD-induced hepatic TAG accumulation and hepatic insulin resistance via PKC ϵ activation.

Key words: insulin resistance, non-alcoholic liver steatosis, lysosomal lipase, protein kinase C ϵ

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
2 Literární přehled.....	11
2.1 Význam tukové tkáně při vzniku jaterní steatózy	11
2.2 Nealkoholická jaterní steatóza.....	12
2.3 Inzulínová senzitivita.....	14
2.4 Lipolyticko-reesterifikační cyklus lipidů v játrech.....	17
2.5 Jaterní lipázy.....	19
2.6 Aktivace lysozomálních enzymů.....	22
3 Cíle diplomové práce	24
4 Materiál a metody	25
4.1 Experimentální zvířata a podávané diety.....	25
4.2 Příprava lysozomální a fagolysozomální frakce.....	26
4.3 Stanovení aktivity jaterních lipáz	26
4.3.1 Stanovení aktivity jaterních lipáz na exogenním substrátu.....	26
4.3.2 Stanovení aktivity jaterních lipáz na endogenním substrátu.....	27
4.4 Elektroforéza a imunodetekce	27
4.5 Inkubace jaterních řízků in vitro.....	28
4.6 Orální glukózový toleranční test.....	28
4.7 Biochemické analýzy.....	29
4.8 Statistické analýzy	29
5 Výsledky.....	30
5.1 Základní charakteristiky experimentálních skupin.....	30

5.2	Vliv vysokotukové diety na metabolismus glukózy a lipidů.....	30
5.3	Aktivita jaterních lipáz v jaterním homogenátu	32
5.4	Identifikace aktivní frakce lysozómů	33
5.4.1	Aktivita kyselé lysozomální lipázy na endo genním substrátu v subcelulárních frakcích	34
5.4.2	Aktivita kyselé lysozomální lipázy na exogenním substrátu v subcelulárních frakcích	35
5.4.3	Produkce diacylglycerolu v inkubovaných frakcích	36
5.5	Přítomnost proteinu kyselé lysozomální lipázy ve frakcích	37
5.6	Vliv vysokotukové diety na ketogenezi v jaterních řízcích <i>in vitro</i>	39
5.7	Vliv vysokotukové diety na inzulínovou rezistenci	39
5.8	Vliv vysokotukové diety na aktivaci PKCε.....	40
6	Diskuse	42
7	Závěr	47
8	Seznam literatury	48

Seznam zkratek

Akt	proteinkináza B
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartataminotransferáza
ATGL	adipozní triacylglycerolová lipáza
BMI	body mass index
cAMP	cyklické AMP
CD 36	cluster of differentiation 36
CPT-1	karnitin-dependentní enzym
CPT-2	karnitin translokáza
DAG	diacylglycerol
DGAT	diacylglyceroltransferáza
ERK	extracelular signal regulated kináza
HL	hepatická lipáza
HMG-CoA	hydroxy-3-methylglytaryl koenzym A
HSL	hormon-senzitivní lipáza
ChREPB	carbohydrate responsive element-binding protein
IP3	inositol trifosfát
IRS	insulin receptor substance
LAL	kyselá lysozomální lipáza

LDL	low density lipoprotein
LPL	lipoproteinová lipáza
MAPK	mitogen activating kináza
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAFLD	nealkoholická jaterní steatóza
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OGTT	orální glukózový toleranční test
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	proteinkináza C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
SREBPS	sterol regulátory element binding proteins
TG	triacylglycerol
TGH	triacylglycerolhydroxyláza
VLDL	very low density lipoprotein

1 Úvod

Nadměrná akumulace tukových zásob v organismu je asociována se vznikem řady závažných onemocnění a patologických stavů, zejména s rozvojem inzulinové rezistence, diabetu mellitu 2. typu, hypertenze, aterosklerózy, dyslipidémie, syndromu cystických ovarií, řadou nádorových onemocnění atd. Z evolučního hlediska představovala tuková tkáň přežití v časech nedostatku nebo při úplné absenci potravy. Pokud je ale kapacita tukové tkáně ukládat přebytečné živiny překročena, hypertrofované adipocyty již nejsou schopny akumulovat další lipidy a dochází k jejich ukládání do jiných tkání, především jater a svalů. Takto ektopicky uložené lipidy závažným způsobem narušují metabolismus buněk a tkání, způsobují poruchy v regulaci glukózového metabolismu a přispívají k dysfunkci a apoptóze těchto buněk.

Nealkoholická jaterní steatóza (NAFLD) je celosvětově nejrozšířenější příčinou obvykle asymptomatického chronického zvýšení jaterních enzymů v séru. Poprvé byla popsána Ludwigem v roce 1980 (Ludwig J., 1980). NAFLD je definovaná jako akumulace tuku přesahující 5 až 10 % hmotnosti jater (Wanless I. R., 1990). Zpravidla bývá přítomno mírné zvýšení aspartaminotransferázy (AST) a alaninaminotransferázy (ALT), nebo se jejich hodnoty blíží horní hranici normy (Vozarova B., 2002). Ačkoli je skutečná prevalence neznámá, odhadovaný výskyt nealkoholické jaterní steatózy je 5 až 20 % u běžné populace a 75 % u pacientů s obezitou nebo diabetem 2. typu (Sanyal A. J., 2002). NAFLD se může dále vyvinout v nealkoholickou steatohepatitidu, což je zánětlivé postižení jater, a v nízkém procentu případů může dospět až do konečného stádia zánětlivého onemocnění cirhózy, které představuje vazivovou přestavbu jaterní tkáně spojenou s významnou poruchou funkce jater (Powell E. E., 1990).

2 Literární přehled

2.1 Význam tukové tkáně při vzniku jaterní steatózy

Zvýšené uvolňování volných mastných kyselin z tukové tkáně do jiných tkání je výsledkem abnormalit v metabolismu tuků spojených s různými metabolickými poruchami, které jsou spjaty s metabolickým syndromem a diabetem 2. typu. Nepříznivé následky zvýšeného toku volných mastných kyselin zahrnují další projevy jako dyslipidemii, jaterní steatózu, zhoršení glukózového metabolismu a inzulínové senzitivity ve svalu a játrech, poškození funkce pankreatických β -buněk.

Nejvhodnějším místem ukládání lipidů je bílá tuková tkáň, která má ale jen omezenou kapacitu. Proto při nadměrném příjmu lipidů dochází k jejímu přesycení a lipidy se ukládají v jiných tkáních. Tento nadměrný příjem mastných kyselin může vést k rozvoji klinických stavů masivní obezity (hypertrofie). Opakem této nemoci je geneticky podmíněný syndrom lipodystrofie (kongenitální lipoatrofie), který je charakterizovaný jako metabolická porucha projevující se nerovnoměrným rozložením tukové tkáně. U lidských a zvířecích modelů lipodystrofie ostatní tkáně v masivním rozsahu akumulují triacylglyceroly, což ve svém důsledku vede k extrémní inzulínové rezistenci (Gavrilova O., 2000). Modely lipodystrofie ukazují, že rozvoj inzulínové rezistence závisí na nerovnováze distribuce tuku mezi tkáněmi (Schulman G. I., 2000). Bylo prokázáno, že pacienti s lipodystrofií měli po příjmu vysokokalorického tučného jídla zvýšený energetický výdej a oxidaci mastných kyselin. Tento kompenzační mechanismus zabraňuje toxickému efektu lipidů (Savage D. B., 2005). Druhým extrémním modelem inzulínové rezistence je hypertrofie adipocytů, který vzniká z pozitivní energetické bilance vedoucí k hypertrofické expanzi bílé tukové tkáně. Je známo, že je hypertrofie asociovaná s inzulínovou rezistencí (Molina J. M., 1989).

Uvolňování mastných kyselin z tukové tkáně do oběhu je řízeno hormon senzitivní lipázou v lačném stavu. V sytém stavu je hlavním zdrojem mastných kyselin cirkulující triacylglyceroly štěpené lipoproteinovou lipázou (LPL). Ke zvýšenému uvolňování volných mastných kyselin z tukové tkáně u pacientů v lačném stavu s diabetem 2. typu dochází v důsledku zhoršení inzulínem způsobené inhibice aktivity HSL (Riemens S. C., 2000).

Za hladovění závisí koncentrace mastných kyselin v séru především na štěpení triacylglycerolů v tukové tkáni a schopnosti ostatních tkání vychytávat a využívat nebo ukládat mastné kyseliny ve formě triacylglycerolů. Postprandiálně se uplatňuje zejména lipoproteinová lipáza, což je enzym regulující štěpení cirkulujících triacylglycerolů a uvolňování volných mastných kyselin pro využití ve tkáních (Fielding B. A., 1998). Jednou z možných metabolických drah, kterými změny v inzulínové senzitivitě mohou ovlivnit lipidový metabolismus, je vstup glukózy do adipocytu, což podmiňuje dostupnost glycerolu pro biosyntézu TAG.

2.2 Nealkoholická jaterní steatóza

Jaterní steatóza nastává, když dojde k nerovnováze mezi množstvím absorbovaných a uvolněných volných mastných kyselin. Jsou známy tři hlavní zdroje volných mastných kyselin přispívající k rozvoji jaterní steatózy. První je periferní tuková tkáň, ze které při inzulínové rezistenci dochází k zvýšenému uvolňování volných mastných kyselin. Druhým zdrojem je tuk přijímaný v potravě. Ten vstupuje do jater v podobě plazmatických neesterifikovaných mastných kyselin a intestinálních chylomikronů. Třetím zdrojem je *de novo* lipogeneze ze sacharidů probíhající v játrech. (Musso G., 2009).

Zvýšená akumulace triacylglycerolů v játrech vyvolává změnu v metabolismu glukózy, mastných kyselin a lipoproteinů a může způsobit zánět, který nepříznivě ovlivňuje zdraví organismu. Lidé se zvýšeným obsahem jaterních triacylglycerolů mají často zvýšené ektopické ukládání tuků v ostatních orgánech a více tělesného tuku (Hwang J. H. 2007).

Jaterní steatóza se rozvíjí v případě, že vstup (absorpce, syntéza) mastných kyselin do jater převyšuje výstup (oxidace, sekrece). Množství triacylglycerolů v hepatocytech závisí na: 1) vstupu mastných kyselin uvolněných hydrolýzou z tukové tkáně nebo z cirkulujících triacylglycerolů; 2) *de novo* syntéze mastných kyselin; 3) oxidaci mastných kyselin; 4) sekreci triacylglycerolů v částicích VLDL.

Hlavním zdrojem volných mastných kyselin pro játra je tuková tkáň, ze které volné mastné kyseliny vstupují do cirkulace a do jater jsou transportovány jaterní tepnou a portální žilou (Nielson S., 2004). Zvýšená genová exprese hepatické lipázy a lipoproteinové lipázy u obézních jedinců naznačuje, že volné mastné kyseliny uvolněné lipolýzou cirkulujících

triacylglycerolů také přispívají ke zvýšenému ukládání mastných kyselin v hepatocytech a k rozvoji steatózy (Pardina E., 2009). K těmto dějům také přispívají membránové proteiny, které transportují volné mastné kyseliny přímo z plazmy do tkáně. CD 36 je hlavní regulátor vstupu volných mastných kyselin z plazmy. U inzulin-rezistentních jedinců je exprese genu CD36 a obsah proteinu v tukové tkáni snížený, ale naopak vyšší v játrech a kosterním svalstvu, což odpovídá zvýšenému obsahu jaterních a intramyocelulárních triacylglycerolů. To znamená, že změna v transportu volných mastných kyselin ve tkáních může zapříčinit ektopickou akumulaci triacylglycerolů přesměrováním plazmatických volných mastných kyselin z tukové tkáně do jiných tkání. (Greco D., 2008).

V játrech probíhá *de novo* syntéza mastných kyselin, kde je acetyl-CoA konvertován na malonyl-CoA prostřednictvím acetyl-CoA karboxylázy a následuje několik metabolických reakcí vedoucích ke vzniku jedné molekuly palmitátu. Mezi nejdůležitější faktory účastníci se těchto reakcí patří acetylkoenzym A 1 a 2, diacylglycerolacyltransferáza (DGAT) 1 a 2, stearoyl-CoA desaturáza 1 a některé transkripční faktory jako sterol regulatory element binding proteins (SREBPS) a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (Musso G., 2009). Jaterní *de novo* lipogeneze je regulovaná nezávisle na inzulinu a glukóze aktivací transkripčních faktorů SREBPs a ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein). Některé studie ukázaly, že jaterní nadměrná exprese SREBPs a ChREBP nebo hyperinzulinémie stimulují lipogenezi a způsobují jaterní steatózu (Shimomura I., 1999). U lidí je nealkoholická jaterní steatóza spojená se zvýšenou expresí některých genů v játrech účastnících se *de novo* lipogeneze (Kohjima M., 2007). Příspěvek *de novo* lipogeneze mastných kyselin v celkové produkci jaterních triacylglycerolů je u zdravých jedinců méně než 5 %, zatímco u jedinců s nealkoholickou jaterní steatózou se zvyšuje až na 15 až 23 % (Diraison F., 2003).

Oxidace jaterních mastných kyselin probíhá především v mitochondriích méně pak v peroxizómech a mikrozómech. Transport mastných kyselin do mitochondriální matrix je regulován karnitin-dependentním enzymem (CPT-1) a karnitin translokázou (CPT-2). Mitochondriální β -oxidace zkrátí řetězec mastné kyseliny o dva uhlíky v každém cyklu prostřednictvím dehydrogenace a hydratace a uvolněný acetyl-CoA může vstupovat do Krebsova cyklu pro kompletní oxidaci a produkci energie, nebo může být přeměněn na ketolátky (acetoacetát nebo β -hydroxybutyrát), které představují zdroj energie pro jiné tkáně

(McGarry J. D., 1980). Některé studie ukazují, že inhibice nebo aktivace oxidace mastných kyselin v játrech ovlivňuje množství jaterních triacylglycerolů a nedostatek mitochondriálních oxidačních enzymů vede k jaterní steatóze (Zhang D., 2007).

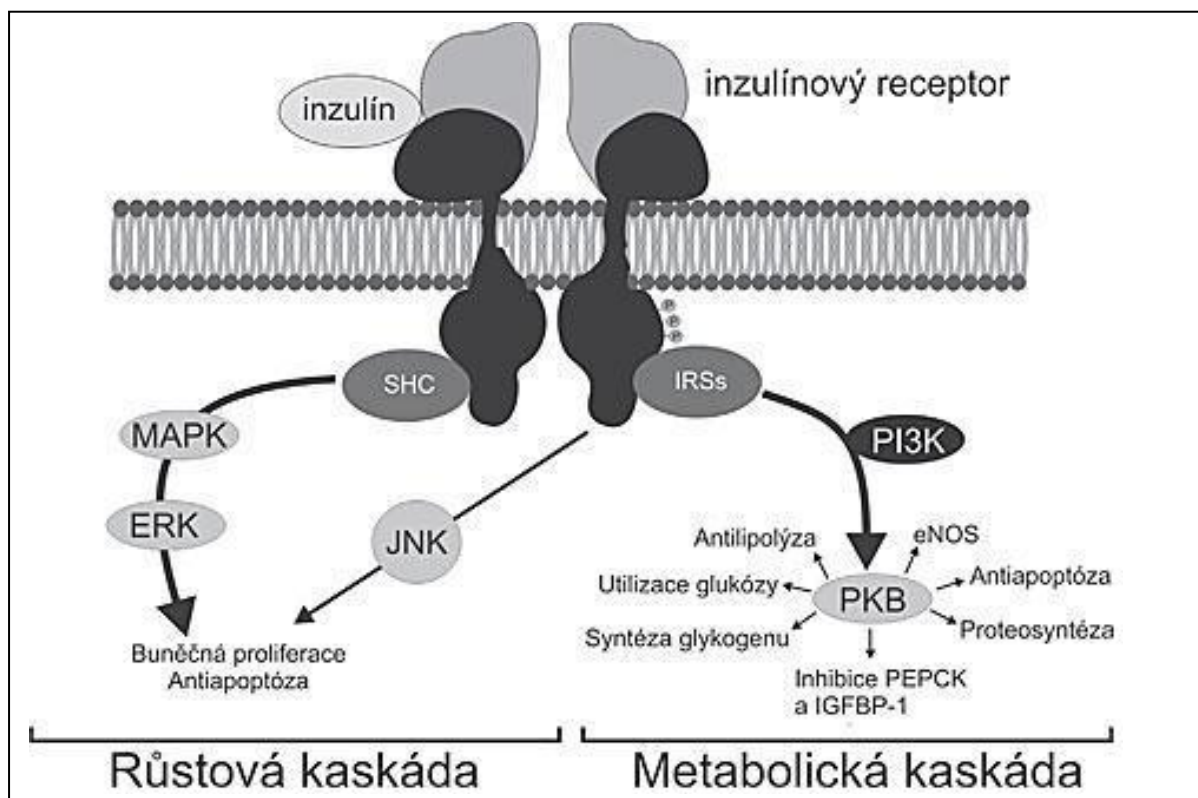
VLDL je komplex lipoproteinových částic, které jsou produkovány játry a sekretovány do tělního oběhu. Formování VLDL částic představuje důležitý mechanismus pro transport ve vodě nerozpustných triacylglycerolů z jater do periferních tkání. Jaterní VLDL vznikají v endoplazmatickém retikulu fúzí nově syntetizovaného lipoproteinu B-100 s triacylglycerolovými kapénkami aktivací mikrozomálního triacylglycerolového transferového proteinu. Mastné kyseliny, které jsou esterifikovány na triacylglyceroly a sekretovány jako VLDL jsou odvozeny z různých zdrojů. Mastné kyseliny mohou být v játrech esterifikovány na triacylglyceroly, inkorporovány do VLDL a sekretovány do oběhu nebo uloženy v játrech. Proto sekrece VLDL poskytuje mechanismus pro redukci jaterních triacylglycerolů. Studie ukázaly, že sekrece VLDL-TG je vyšší u jedinců s nealkoholickou jaterní steatózou než u jedinců s normálním obsahem triacylglycerolů v játrech (Fabbrini E., 2008).

2.3 Inzulínová senzitivita

Inzulín má důležitý metabolický efekt v mnoha orgánech. Inzulínová rezistence je definována jako poškození inzulínem zprostředkované absorpce glukózy v kosterním svalu, ale může se rozvinout i v jiných tkáních. Inzulínová rezistence je také asociována s obezitou a nealkoholickou jaterní steatózou. V současnosti je jaterní steatóza důležitým znakem orgánové inzulínové rezistence nezávislé na BMI, procentu tělesného tuku a množství tělesného tuku (Korenblat K. M., 2008).

Inzulínová rezistence se může projevit při poruše na kterékoli úrovni inzulínové signalizační kaskády, od změny struktury nebo funkce inzulínového receptoru až po defekt postreceptorových dějů (Obr. 1). Na molekulární úrovni inzulín po navázání na α -podjednotku inzulínového receptoru aktivuje tyrozinkinázu, která je zodpovědná za autofosforylaci tyrozinových zbytků β -podjednotky inzulínového receptoru a fosforylaci specifických intracelulárních signálních proteinů IRS 1 až 3 (insulin receptor substrate). Tato aktivace je následována kaskádou vzájemně podmíněných navazujících fosforylací

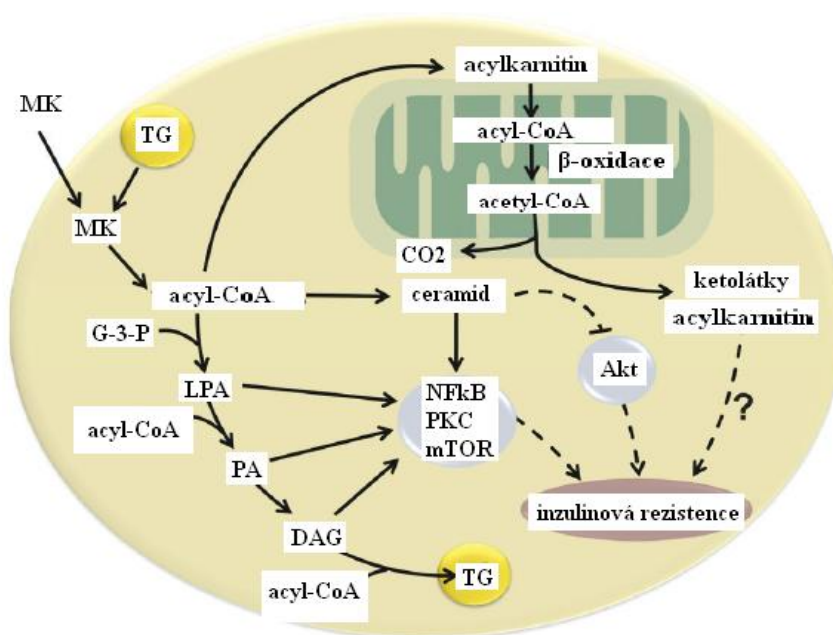
řady dalších intracelulárních proteinů. V zásadě se ubírá dvěma směry: přes fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), která představuje metabolickou kaskádu nebo přes mitogen activating kinázu (MAPK), která představuje růstovou kaskádu. Zatímco transdukce signálu cestou MAPK je aktivovaná řadou růstových faktorů včetně inzulínu, kaskáda vedoucí přes fosfatidylinositol-3-kinázu je aktivována výhradně inzulínem. MAPK aktivuje ERK (extracellular signal regulated kinase) a aktivuje buněčnou proliferaci a antiapoptózu. IP3 aktivuje fosfatidylinositol-3-kinázu, následně je aktivovaná proteinkináza B a ta aktivuje antilipolýzu, utilizaci glukózy a další metabolické děje (Zick Y., 2004).



Obr. 1: Inzulínová signalizační kaskáda (upraveno podle Van den Berghe G., 2004).

Buněčné mechanismy zodpovědné za rozvoj inzulínové rezistence nejsou zcela jasné. Studie naznačují, že nadměrná produkce intermediátů lipidového metabolismu může interferovat s činností inzulínové signální dráhy (Nagle C. A., 2007).

Mastné kyseliny pocházející přímo z cirkulace nebo uvolněné z endogenních triacylglycerolů jsou metabolizovány za vzniku různých intermediálních sloučenin (Obr. 2). Bylo prokázáno, že tyto metabolity mohou interferovat s přenosem inzulínového signálu na různých úrovních inzulínové signální kaskády. Intracelulární triacylglyceroly pocházející z plazmy nebo z lipolýzy mohou být transportovány do mitochondrií pro oxidaci nebo metabolizovány na acylkoenzym A, ceramidy, lysofosfatidovou kyselinu, fosfatidovou kyselinu a diacylglycerol. Diacylglycerol vzniká při biosyntéze i degradaci triacylglycerolu. 1,2 sn-DAG je významným aktivátorem některých zástupců velké enzymové skupiny protein kinázy C. Některé izoformy PKC (např. PKCε) mohou fosforylovat inzulínový receptor na serinu a tím negativně ovlivňovat přenos inzulínového signálu. Další intermediáty lipidového metabolismu mohou také interferovat s inzulínovou signalizací prostřednictvím aktivace mTOR kinázy (mammalian target of rapamycin) a NF-κB. Těmito intermediáty jsou produkty neúplné degradace mastných kyselin v mitochondriích, jako například acylkarnitin a ketolátky (Nagle C. A., 2009).



Obr. 2: Potencionální buněčné mechanismy zodpovědné za vztah mezi metabolismem mastných kyselin a inzulínovou rezistencí v játrech nebo ve svalu (Fabbrini E., 2010); MK: mastná kyselina; TG: triacylglycerol; acyl-CoA: acylkoenzym A; G-3-P: glycerol-3-fosfát; LPA: lipoproteinová kyselina; PA: palmitová kyselina; DAG diacylglycerol; acetyl-CoA: acetylkoenzym A; Akt: proteinkináza B; NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PKC: proteinkináza C; mTOR: mammalian target of rapamycin

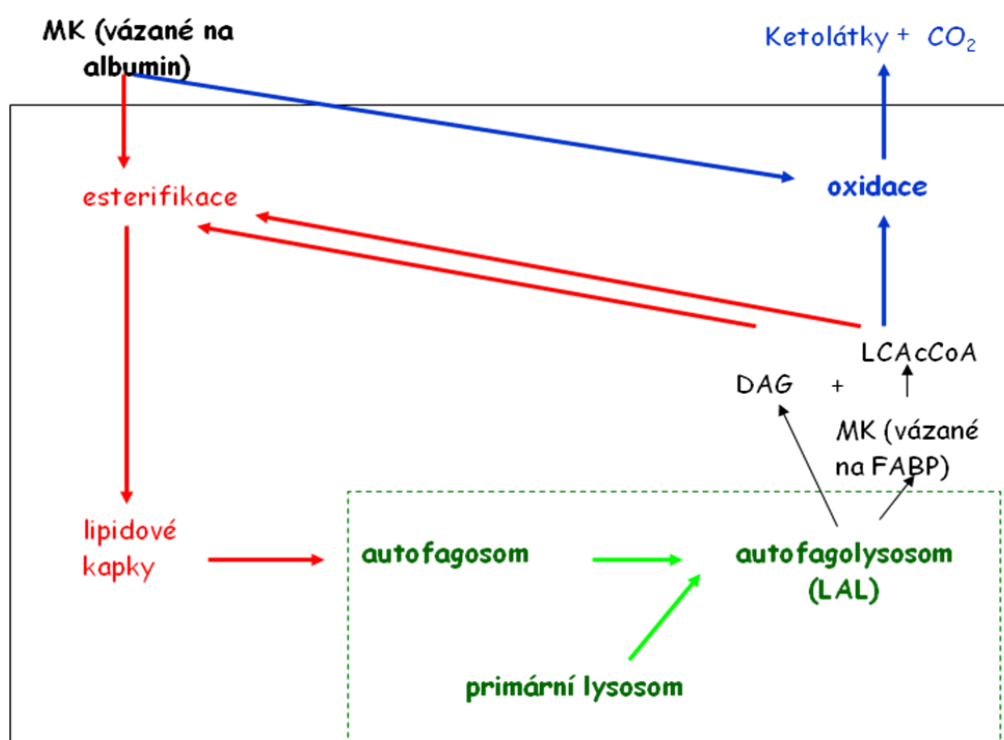
Je třeba zdůraznit, že jaterní steatóza nemusí být vždy asociovaná s inzulínovou rezistencí. Experimentálně navozená nadměrná exprese jaterní DGAT nebo farmakologická blokáda β -oxidace u myši způsobila jaterní steatózu, ale nezpůsobila inzulínovou rezistenci jater a kosterního svalstva, zatímco inhibice syntézy triacylglycerolů v játrech u obézních myši snížila jaterní steatózu, ale nezlepšila inzulínovou senzitivitu. Tyto výsledky podporují teorii, že k rozvoji jaterní inzulínové rezistence přispívají spíše intracelulární lipidové metabolity než samostatné triacylglyceroly *per se* (Yu X. X., 2005). Zvýšená esterifikace mastných kyselin na triacylglyceroly poskytuje pro hepatocyty prevenci proti akumulaci potenciálně toxických intermediátů lipidového metabolismu (Watt M. J., 2009).

Model dietně indukované steatózy je charakterizován velmi rychlým nástupem hepatické inzulínové rezistence. Kraegen sledoval progresivní změny v rozvoji inzulínové rezistence ve tkáních u potkanů krmených vysokotukovou dietou. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin, kdy jedna byla krmena vysokotukovou dietou 3 dny a druhá 3 týdny. Bazální a inzulínem stimulovaný metabolismus byl hodnocen v sytém stavu zvířate pomocí hyperinzulínového clampu. Vysokotuková dieta snížila vliv inzulínu na vstřebávání glukózy v játrech již po 3 dnech, ale zhoršení inzulínem stimulované periferní glukózové utilizace nastalo až po 3 týdnech diety. Po 3 dnech podávání diety došlo ke vzniku inzulínové rezistence v tukové tkáni, ale ne ve svalové tkáni. Množství triacylglycerolů ve svalové tkáni se signifikantně zvýšilo až po 3 týdnech. Po této době se u zvířat také rozvinula glukózová intolerance. Z toho vyplývá, že podávání vysokotukové diety navozuje inzulínovou rezistenci v játrech a tukové tkáni dříve než ve svalech (Kraegen E. W., 1991).

2.4 Lipolyticko-reesterifikační cyklus lipidů v játrech

Játra mají schopnost uskláňovat neutrální lipidy v kapénkách v cytosolu nebo je sekretovat do oběhu v podobě VLDL částic (Olofsson S. O., 1999). Exogenní mastné kyseliny vstupující do hepatocytu nejsou hned využity pro sekreci triacylglycerolů, ale dochází k jejich uskladnění (Gibbons G. F., 1992). Některé pokusy kvantitativně určily, že zásoby lipidových kapének v hepatocytu podléhají opakovaně cyklu lipolýzy a následné reesterifikaci. Wiggins a Gibbons využili metody dvojího značení ke sledování obratu intracelulárních triacylglycerolů v primárních hepatocytech. Izolované hepatocyty byly

kultivovány 18 hodin v přítomnosti ^3H -oleátu (označené acylové zbytky molekuly triacylglycerolů) a ^{14}C -glycerolu (označení glycerolové kostry v molekule triacylglycerolu). Poté byly hepatocyty inkubovány bez exogenních mastných kyselin, ale v přítomnosti neznačeného laktátu a pyruvátu (zdroj glycerolu) a byly sledovány změny v intenzitě značení intracelulárních a sekretovaných triacylglycerolů. Z výsledku pokusů vyplývá, že došlo k 70% poklesu ^{14}C -značení v intracelulárních a sekretovaných triacylglycerolech, což naznačuje, že původní glycerol (v triacylglycerolu) byl naředěn neznačeným glycerolem. Intenzita značení ^3H se v průběhu pokusu nezměnila, takže nedocházelo k syntéze triacylglycerolů *de novo*. Rychlost lipolýzy byla dvakrát až třikrát větší, než která byla potřebná pro udržení sledované rychlosti sekrece triacylglycerolů. Většina uvolněných mastných kyselin se vrátila do intracelulárních zásob (Wiggins D., 1992).



Obr. 3: Lipolyticko-reesterifikační cyklus intracelulárních triacylglycerolů v játrech

Tento cyklus může být ovlivněn působením různých látek. Podáním glukagonu a cyklického AMP dochází k urychlení intracelulární lipolýzy, ale v tomto případě uvolněné mastné kyseliny (přinejmenším v játrech potkana) jsou využity více k oxidaci než k reesterifikaci nebo sekreci (Debeer L. J., 1982). Tolbutamid inhibuje intracelulární lipolýzu a ve větší míře potlačuje sekreci VLDL částic. Zvyšující se sekrece VLDL triglycerolu sledovaná po vystavení buněk působení inzulinu nebyla doprovázena zvýšenou lipolýzou (Wiggins D., 1992).

Lancker použil techniku dvojího značení k rozlišení začleněných acylových řetězců v triacylglycerolu, které pocházely z exogenních nebo endogenních zdrojů mastných kyselin. Exogenní ^{14}C mastné kyseliny představovaly asi jen 17 % z celkových acylových řetězců sekretovaných ve formě VLDL částic, což znamená, že většina acylových řetězců pocházela z cytoplasmatických zásob triacylglycerolů (Lancker D. L., 1998).

60 až 70 % sekretovaných triacylglycerolů pochází z lipolýzy a reesterifikace intracelulárních triacylglycerolů a maximálně 40 % z přímě sekrece cirkulujících triacylglycerolů. To souhlasí s množstvím jaterních triacylglycerolů podléhajících lipolýze na diacylglycerol nebo monoacylglycerol a jejich následné reesterifikaci na triacylglyceroly, které jsou pak sekretovány ve formě VLDL, nebo se vrací do jaterních zásob (Yang L. Y., 1996).

2.5 Jaterní lipázy

V játrech se nachází čtyři hlavní lipolytické enzymy: hepatická lipáza (HL), kyselá lyzozomální lipáza (LAL), triacylglycerolhydroláza (TGH) a adipozní triacylglycerolová lipáza (ATGL).

Hepatická lipáza (HL) je syntetizována v endoplazmatickém retikulu hepatocytu a je lokalizována na povrchu jaterních sinusoidálních kapilár. U člověka je tento enzym nejvíce vázaný na povrchu hepatocytů a také na sinusoidálních epitelálních buňkách. Spolu s lipoproteinovou lipázou má mnoho strukturálních a funkčních podobností. Její hlavní fyziologickou funkcí je odbourávání lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly a degradace

HDL-lipoproteinů. *In vitro* je nejvyšší aktivita hepatické lipázy při pH 9,5 (Assmann G., 1973).

Triacylglycerolhydroláza (TGH) patří do enzymatické rodiny karboxylesteráz a je nejvíce aktivní při neutrálním pH a to při pH 7 až 8. Poprvé byl izolován z prasečích jaterních mikrosómů. Je lokalizovaný v lumen endoplazmatického retikula (Lehner R., 1997). Při nedostatku tohoto enzymu jsou nedostatečně mobilizovány zásobní triacylglyceroly pro VLDL sekreci (Gibbons D., 1994).

ATGL byla poprvé objevena v roce 2004. Kromě hydrolýzy triacylglycerolů se účastní také transacylace a má také fosfolipázovou aktivitu (Jenkins C. M., 2004). Ve srovnání s ostatními tkáněmi (bílá tuková tkáň, hnědá tuková tkáň, kosterní a srdeční sval) je jeho exprese v játrech poměrně nízká. Při experimentálně navozené nadměrné expresi ATGL v jaterních buňkách se zvyšuje mobilizace a spotřeba buněčných zásob triacylglycerolů (Reid B. N., 2008).

Kyselá lysozomální lipáza (LAL) je lipolytický enzym, exprimovaný v různých buněčných typech zahrnujících fibroblasty, makrofágy, lymfocyty a jaterní buňky (Fowler S. D., 1984). Enzym je syntetizován v endoplazmatickém retikulu a poté je dopraven do lysozomu (Sando G. N., 1982). Optimum pro funkci kyselé lysozomální lipázy v lysozomu je pH 4,5 až 5 (Teng M. T., 1974). Tento enzym je schopný štěpit dva typy substrátů a to cholesterolestery a triacylglyceroly. Z cholesterolesteru je uvolněn samotný cholesterol, který je transportován z lysozomu do cytosolu, kde zvyšuje cytoplazmatickou hladinu cholesterolu a spouští důležité regulační kroky: 1) snižuje aktivitu hydroxy-3-metylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA), který představuje důležitý krok v produkci cholesterolu, 2) snižuje aktivitu LDL-receptoru a HMG-CoA reduktázy, která je regulovaná transkripčními faktory SREBP-1 a SREBP-2, které snižují vstup lipoproteinů do lysozomu, a 3) aktivuje acyl-CoA: cholesterolacyltransferázu, která se účastní cytoplazmatické resyntézy cholesterol esteru. Tyto děje ukazují hlavní roli kyselé lysozomální lipázy v homeostáze buněčného cholesterolu a mastných kyselin (Assmann G., 1995).

Kyselá lysozomální lipáza se dále podílí na štěpení intracelulárních triacylglycerolů. Debeer prokázal, že maximální lipolytická aktivita je po předchozím promytí heparinem (odstranění jaterní lipázy) v jaterním homogenátu prokázána při pH 4,4, o něco menší aktivita byla zaznamenána při pH 6,6. Velmi malá nebo žádná lipolytická aktivita byla

v rozmezí pH 7,4 až 9,6. Subcelulární distribuce lipolytické aktivity v pH 4,4 až 6,6 zcela kopírovalo distribuci kyselé fosfatázy. Lysomotropní látky, které zvyšují pH v lysozomu, jako chloroquin, amoniak a metylamin částečně inhibovaly oxidaci endogenních mastných kyselin v izolovaných hepatocytech sytých potkanů. Debeer ze svých výsledků odvodil, že kyselá lysozomální lipáza je intracelulární lipáza štěpící triacylglyceroly v parenchymálních buňkách, konkrétně v lysozomech (Debeer L. C., 1979).

Hayase prokázal, že triacylglyceroly jsou štěpeny izolovanou lysozomální lipázou a hlavními produkty štěpení je diacylglycerol a volná mastná kyselina (Hayase K., 1970).

Nedostatek kyselé lysozomální lipázy u lidí je asociován s dvěma fenotypy: porucha uskladnění cholesterylesteru (CESD) a Wohlmanova choroba (WD), která představuje úplnou absenci kyselé lysozomální lipázy. Wohlmanova choroba se projevuje již během prvního roku života a končí většinou smrtí v důsledku masivního ukládání cholesterylesteru a triacylglycerolů v játrech a tenkém střevu, což má za následek kachexii v důsledku malabsorbce. CESD je charakterizované ukládáním cholesterol esteru v mnoha tělesných tkáních, ačkoli hepatomegalie může být jediným projevem. Pacienti s tímto syndromem se dožívají středního věku (Assmann G., 1995).

Vysoká míra exprese kyselé lysozomální lipázy byla prokázána v jaterních parenchymálních a Kupferových buňkách, v makrofázích ve slezině, epiteliálních buňkách tenkého střeva a v renálních epiteliálních buňkách (Du H., 1996). U myši byla exprese v srdečních buňkách a buňkách kosterního svalstva nižší.

Význam kyselé lysozomální lipázy v degradaci intracelulárních triacylglycerolů prokázal Du na modelu LAL-knockout ($lal^{-/-}$) myši. Absence kyselé lysozomální lipázy způsobuje změny v mobilizaci mastných kyselin, inzulínové senzitivitě a přesunu lipidových zásob z hepatocytu do Kupferovy buňky. Tyto změny mají vliv na tělesný energetický metabolismus a ukazují, že jaterní makrofágy se přímo účastní celkového cholesterolového a triacylglycerolového metabolismu (Du H., 2001).

2.6 Aktivace lysozomálních enzymů

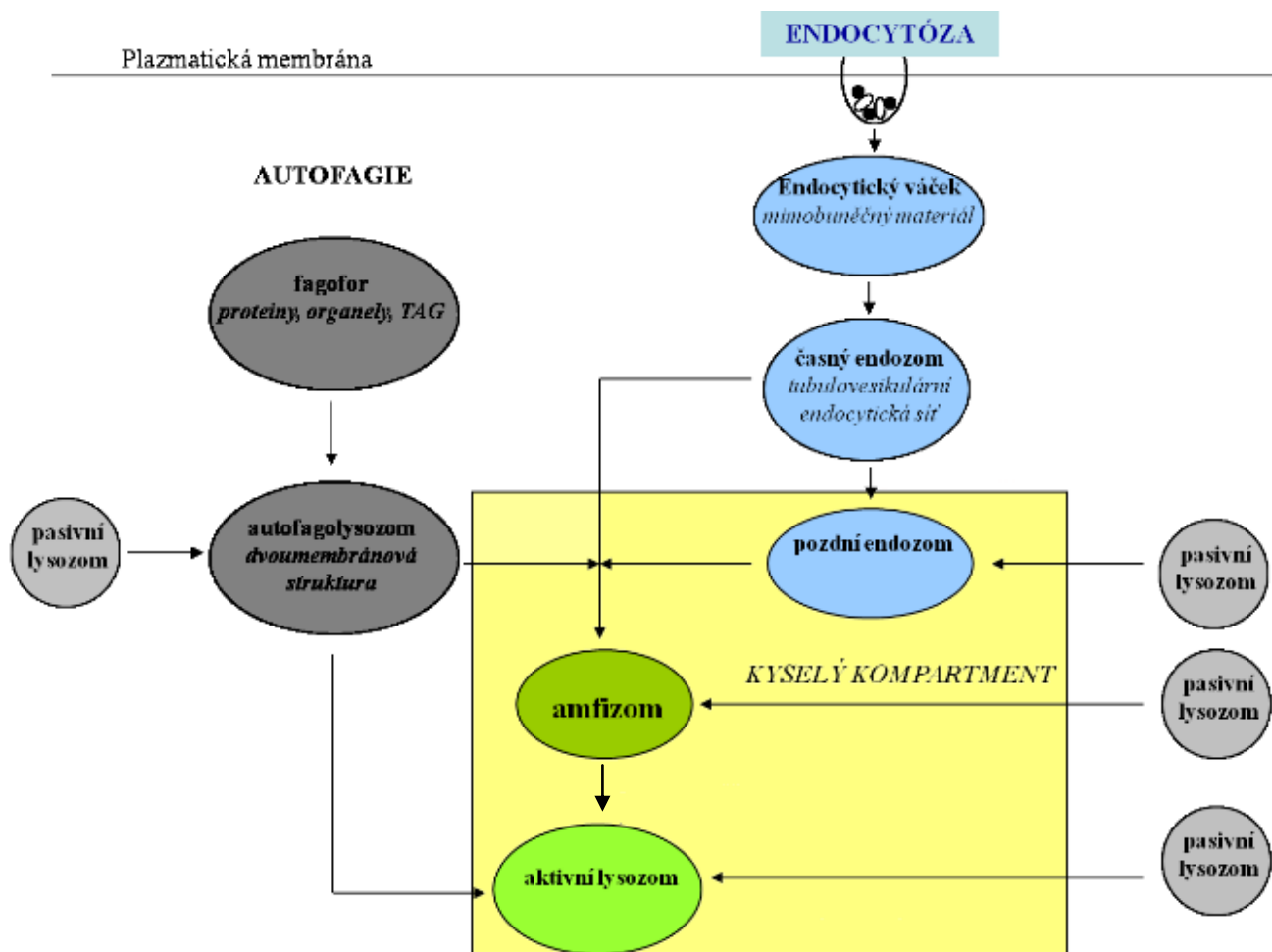
Látky určené k degradaci jsou do lysozomu dopravovány dvěma způsoby: autofagickou cestou nebo endofytickou cestou. Autofagie je proces, při kterém dochází k degradaci vlastních buněčných komponent v lysozomech. Představuje důležitý mechanismus v udržení stálého vnitřního prostředí v buňce. Během hladovění poskytuje autofagie zdroj živin pro výrobu energie a udržení energetické rovnováhy (Seglen P. O., 1985).

Prvním krokem v autofagické dráze je vytvoření fagofóru, který ohraničuje nepotřebné proteiny, organely a triacylglyceroly. Ten se v oblasti cytoplazmy uzavře v dvoumembránovou organelu, která se nazývá autofagozom (Fengsrud M., 1995). Biochemické studie ukázaly, že se autofagozom může spojit s endozomem a vytvořit tak prelysozomální autofagickou/endocytickou vakuolu, která se nazývá amfizom (Gorden P. B., 1988). Ten má pravděpodobně kyselý charakter, který je dán aktivitou protonových pump přítomných v membráně pohlceného endozomu (Strømhaug P. E., 1993).

Autofagozomy mohou také přímo fúzovat s lysozomy bez nutnosti vytvoření amfizomu (Pfeifer U., 1978). Morfometrické studie však ukázaly, že jaterní endozomy častěji vstupují do dráhy vedoucí k amfizomu, než k přímému vzniku lysozomu (Liou W., 1997). Aktivní lysozomy mohou vzniknout z dvou- i vícemembránových autofagozomů a mají pouze jednu hraniční membránu, zatímco amfizomy nemají žádné určité morfologické charakteristiky (Holen I., 1995).

Současné studie prokázaly, že amfizomy lze odlišit na základě fyzikálních a morfologických metod od ostatních endocytických a autofagických váček. Pomocí hustotního gradientu, lze oddělit složku jaterních endozomů od lysozomů (Tolleshaug H., 1979).

Endocytózou vzniká endocytický váček, ze kterého se vytvoří časný endozom. Ten je součástí tubulovezikulární endocytické sítě. Časný endozom maturuje ve volný multivezikulární endozom, který se také nazývá pozdní. Ty mohou poté podléhat opakované fúzi s membránou amfizómu. (Holen I., 1995).



Obr. 4: Konvergence autofagické a endozomální cesty (upraveno podle Berg T. O., 1998 a Eskelinen E. L., 2005).

3 Cíle diplomové práce

Testovaná hypotéza: „Rozvoj jaterní inzulínové rezistence při jaterní steatóze je kauzálně spojený se změnami v degradaci intracelulárních TAG v játrech.“

S cílem ověřit tuto hypotézu jsme provedli následující experimenty:

1. Stanovení aktivity jednotlivých jaterních lipáz vzhledem k různým substrátům, identifikace enzymu(ů), jejichž podíl na štěpení intracelulárních TAG je nejvýznamnější.
2. Sledování vlivu vysokotukové diety na aktivitu příslušné lipázy (lipáz).
3. Kvantifikace produkce DAG jako významného intermediátu metabolismu TAG; stanovení vlivu diety.
4. Identifikace možných mechanismů podmiňujících vztah mezi změnami v tvorbě intermediátů lipidového metabolismu a nástupem inzulínové rezistence v játrech při jaterní steatóze.

4 Materiál a metody

4.1 Experimentální zvířata a podávané diety

K pokusům byli použiti potkani kmene AVN. Tito potkani pocházeli z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Kmen AVN je odvozen od kmene Wistar inbredním křížením. Potkani byli chováni v chovných nádobách po čtyřech nebo pěti jedincích v místnosti se standartními podmínkami při konstantní teplotě (25 °C) a při konstantním světelném režimu (12 hodin tma, 12 hodin světlo). Zvířata měla volný přístup k vodě a byla krmena *ad libitum* standartní peletovanou dietou.

Tříměsíční potkani byli rozděleni do dvou skupin. Jedné byla podávána kompletní krmná směs pro laboratorní myši a potkany M2 (Bonagro, ČR) a druhá skupina byla krmena vysokotukovou dietou po dobu 2 týdnů (tabulka 1). Vysokotuková dieta obsahovala 70 kalorických procent saturevaného tuku (sádlo), 20 kalorických procent proteinů a 10 kalorických procent sacharidů.

Porucha inzulinové signální dráhy byla hodnocena u sytých zvířat, kterým byl 40 minut před dekapitací i.p. podán inzulin (6U/kg).

K pokusu byli použiti výhradně samci. Experimenty probíhaly v souladu s předpisy etické komise a se zákonem ČNR č. 246/1992 Sb. pro ochranu zvířat proti týrání.

	VTD (hm. %)
kasein	8,0
sušené mléko	12
vojtěška	5,0
vitamínová směs	1,0
minerální směs	1,0
tuk	41
sušené droždí	12
šrot	-
škrob, pšenice	20

Tabulka 1: Složení vysokotukové diety

4.2 Příprava lysozomální a fagolysozomální frakce

Lysozomy a fagolysozomy představují heterogenní populaci organel sedimentujících v širokém rozsahu míry centrifugace. Aktivní fagolysozomy mají menší hustotu než malé neaktivní lysozomy. 20% homogenát (hmotnost/objem) jsme připravili homogenizací jaterní tkáně v homogenizačním roztoku, který obsahoval 0,25M sacharózu; 0,001M EDTA pH 7,4; heparin 7 IU/ml; 1mM PMSF; leupeptin 10 µg/ml; aprotinin 10 µg/ml. K homogenizaci byl použit teflonový pístový homogenizátor. Zbytky tkáně byly odstraněny centrifugací při 850g po dobu 4 minut při 4 °C. Lehké a těžké lysozomy byly separovány centrifugací při 10 000g po dobu 20 minut při 4 °C. Lehčí lysozomy zůstávají v těchto podmínkách v supernatantu, těžší sedimentují v peletě.

4.3 Stanovení aktivity jaterních lipáz

Lipolytická aktivita v homogenátu byla stanovena podle uvolňování mastných kyselin z triacylglycerolového substrátu. Jednotlivé lipázy byly určeny podle pH optima.

4.3.1 Stanovení aktivity jaterních lipáz na exogenním substrátu

Při tomto experimentálním uspořádání byl jako substrát použit emulgovaný ^3H -značený triolein. Za této situace je substrát přítomen vždy v nadbytku a lipolytická aktivita vzorku závisí pouze na množství přítomného enzymu. Aktivita byla stanovena ve 4% jaterním homogenátu nebo jednotlivých frakcích připravených z čerstvé jaterní tkáně. Reakční médium, které obsahovalo 92,5 kBq ^3H -triolein, 100µM triolein, 110µM lecitin 0,15M NaCl bylo emulgováno sonikací (Hiesler sonicator UP200S) po dobu 20 minut a poté inkubováno s jaterním homogenátem, nebo frakcemi po dobu 60 min při teplotě 30 °C při různých hodnotách pH (pH 4,5: 0,1M acetátový pufr, pH 8: 0,1M Tris a pH 9,5: 0,1M glycinový pufr). Inkubace byla zastavena přidáním směsi metanol: chloroform: heptan

v poměru 1,41 : 1,25 : 1. Uvolněné mastné kyseliny byly přidáním 0,5M NaOH převedeny do formy rozpustné soli a vodná fáze byla oddělena centrifugací (970 g, 20 minut). Z horní vodné fáze, ve které byly rozpuštěny mastné kyseliny, jsme odebrali 0,8 ml a v tomto extraktu uvolněných mastných kyselin byla stanovena radioaktivita.

4.3.2 Stanovení aktivity jaterních lipáz na endogenním substrátu

V tomto experimentálním uspořádání jsou jediným zdrojem substrátu triacylglyceroly přítomné v játrech. Za těchto experimentálních podmínek závisí lipolytická aktivita jak na množství enzymu, tak na dostupnosti substrátu. Můžeme tak sledovat vliv zvolených parametrů na intracelulární přesuny enzymu i substrátu. Lipázová aktivita byla stanovena v 10% jaterním homogenátu a jednotlivých frakcích připravených z čerstvé jaterní tkáně. Tyto frakce byly připraveny za isoosmotických podmínek, čímž se zabránilo prasknutí lysozómů. Frakce byly inkubovány po dobu 60 minut při 30 °C ve vodní třepací lázni při různých hodnotách pH (pH 4,5: 0,2M acetátový pufr, pH 8: 0,2M Tris a pH 9,5: 0,2M glycinový pufr). Reakce byla zastavena přidáním směsi metanol:chloroform (v poměru 2:1). Směs byla separována pomocí 1M NaCl. Spodní chloroformová fáze byla oddělena pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC). Lipidové komponenty (volné mastné kyseliny a diacylglyceroly) jsme zviditelnily pomocí barvicího roztoku s obsahem Coomassie blue a kvantifikovali použitím Quantity One software. Jako standarta byla použita kyselina palmitová a 1,2-dioleylelycerol o známé koncentraci.

4.4 Elektroforéza a imunodetekce

Jaterní homogenát byl připraven postupem popsaným výše. Frakce celkových membrán a cytosolické frakce byly připraveny centrifugací homogenátu při 100 000g po dobu 60 minut při 4 °C. Membránové frakce byly solubilizovány pomocí 1% Tritonu X-100, 0,1% SDS a 0,5% deoxycholátu. Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE

a elektroforeticky přeneseny na FVDF (polyvinylidendifluorid) membránu. Množství proteinu bylo stanoveno imunodetekcí pomocí ECL. Pro stanovení byly použity protilátky: proti PKC ϵ (Santa Cruz Biotechnology) ředěná 1:100, proti fosfo-mTOR (Ser2448) ředěná 1:750 (Cell Signaling Technology, Boston), proti fosfo-AKT (Ser473) ředěná 1:1000 (Cell Signaling Technology, Boston), proti LAL (Abcam, Cambridge, UK) ředěná 1:1000. Intenzita luminiscence byla vyhodnocena pomocí FUJI LAS-3000 imager (FUJI FILM, Japan) a softwaru Quantity One (Biorad, Hercules, CA).

4.5 Inkubace jaterních řízků *in vitro*

Produkce β -hydroxybutyrátu z jaterních řízků *in vitro* byla měřena v nepřítomnosti exogenních volných mastných kyselin. Jaterní řízky, které byly silné asi 1 milimetr, byly inkubovány 2 hodiny v Krebs-Ringer-bikarbonátovém pufru s glukózou (5 mmol/l), 2% albuminem, v prostředí, kde bylo 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C v třepající se vodní lázni. Inkubační médium bylo zamraženo a později v něm byl stanoven obsah ketolátek.

4.6 Orální glukózový toleranční test

Metodou orálního glukózového tolerančního testu byla zjištěna rychlost úbytku glukózy v krvi. Zvířata byla vystavena nočnímu lačnění. Glukóza byla aplikována sondou per os do žaludku v dávce 3 g/kg tělesné hmotnosti. Po aplikaci byla měřena hladina glukózy v krvi v čase 0, 30, 60, 120, 180 minut.

4.7 Biochemické analýzy

Koncentrace volných mastných kyselin, inzulínu, triacylglycerolu a glukózy v séru, aktivita kyselé fosfatázy a produkce ketolátek byly stanoveny pomocí komerčních kitů (volné mastné kyseliny: FFA half micro test, Roche Diagnostics GmbH, Germany; ALT a AST: kity Roche/Hitachi 912 10851132 a Roche/Hitachi 10851124; triacylglycerol: Pliva-Lachema (Brno, ČR); glukóza: Pliva-Lachema (Brno, ČR); inzulín: Mercodia, Sweden; aktivita kyselé fosfatázy: AP assay kit Sigma-Aldrich St. Luis USA; produkce ketolátek: RanBut, Randox UK) .

4.8 Statistické analýzy

Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka. Statistická analýza byla provedena s použitím Kruskal-Wallisova testu s mnohonásobných srovnáním. Hladina statistické významnosti byla určena na $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Základní charakteristiky experimentálních skupin

Základní charakteristiky experimentálních skupin jsou shrnuty v tabulce 2. Dvoutýdenní podávání vysokotukové diety vedlo k vyššímu nárůstu tělesné hmotnosti a adiposity se srovnání se skupinou, které byla podávána standartní dieta. Adiposita byla vypočtena jako poměr váhy epididymálního tukového tělesa v gramech na 100 g celkové tělesné hmotnosti zvířete. Poškození jater bylo hodnoceno podle koncentrace ALT a AST v séru. Uvolňování AST značí rozpad jaterních buněk a uvolňování ALT indukuje poškození mitochondrií. Ani jeden z těchto faktorů nebyl podáváním vysokotukové diety ovlivněn.

	standartní dieta	vysokotuková dieta
hmotnost (g)	331 ± 6.9	379 ± 10.7 ^x
adiposita	0.09 ± 0,06	1.4 ± 0.04 ^x
ALT (μkat/l)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1
AST (μkat/l)	4.3 ± 0.6	3.9 ± 0.3

Tabulka 2: Základní charakteristiky experimentálních skupin. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, n = 5-7; ^x p < 0,05 VTD sv SD;

5.2 Vliv vysokotukové diety na metabolismus glukózy a lipidů

Podávání vysokotukové diety ovlivnilo základní parametry glukózového metabolismu. U potkanů na vysokotukové dietě jsme nepozorovali negativní dopad na metabolismus lipidů (tabulka 3). Zhoršení metabolismu glukózy se projevilo signifikantním zvýšením lačné glykémie a inzulinémie. Dále došlo ke zhoršení glukózové tolerance, která byla zjištěna použitím metody orálního glukózového tolerančního testu (OGTT). Koncentrace β-hydroxybutyrátu v séru byla signifikantně zvýšena u zvířat na vysokotukové

dietě jak v lačném, tak v sytém stavu, což indikuje zvýšené využití mastných kyselin pro ketogenezi.

	standartní dieta		vysokotuková dieta	
	lačné	syté	lačné	syté
glykémie (mmol/l)	5.1 ± 0.1	7.9 ± 0.5 ⁺	5.9 ± 0.2 [*]	8.1 ± 0.3 ⁺
inzulinémie (pmol/l)	56 ± 15	135 ± 21 ⁺	125 ± 10 [*]	127 ± 18
OGTT₀₋₁₈₀ (mmol glukózy/l)	1168 ± 26.6		1325 ± 32.9 ^x	
Tg v séru (mmol/l)	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.08 ⁺	0.7 ± 0.02	1.4 ± 0.1 ⁺
NEMK v séru (mmol/l)	0.7 ± 0.05	0.4 ± 0.02 ⁺	0.6 ± 0.08	0.45 ± 0.07 ⁺
β-hydroxybutyrát (μmol/l)	1.67 ± 0.05	0.05 ± 0.01 ⁺	3.2 ± 0.25 [*]	0.28 ± 0.05 ^{#,+}

Tabulka 3: Parametry glukózového a lipidového metabolismu. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, n = 5-7; ^x p < 0,05 VTD sv SD; ^{*} p < 0,05 lačné VTD vs lačné SD; [#] p < 0,05 syté VTD vs syté SD; ⁺ p < 0,05 syté vs lačné

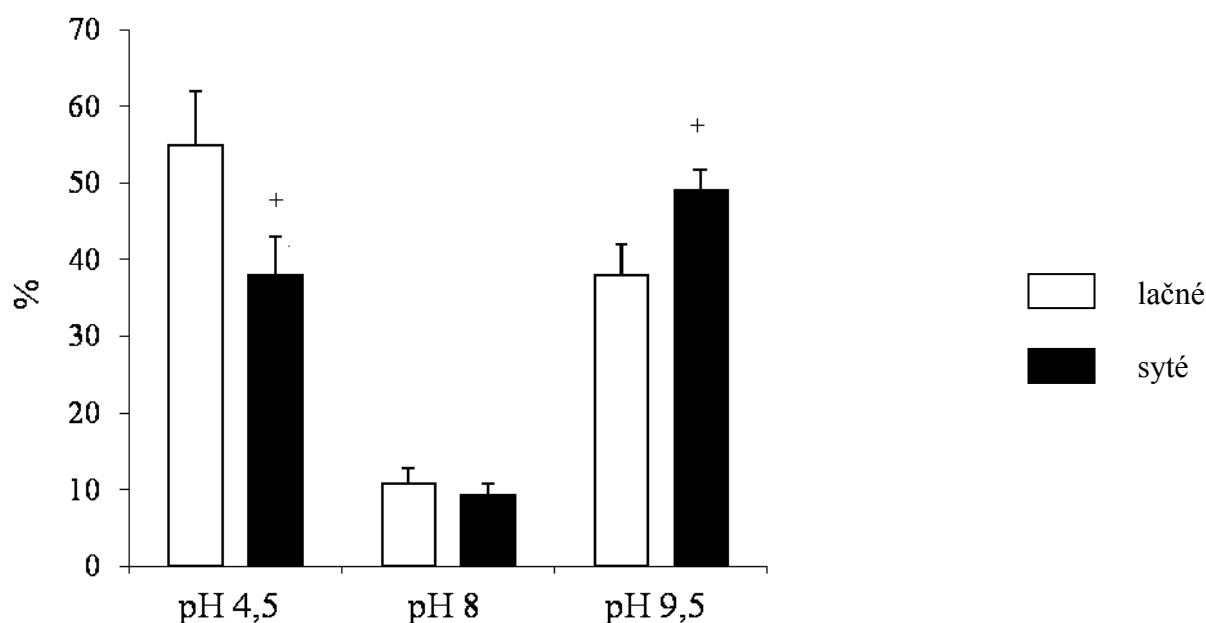
Tabulka 4 shrnuje obsah energeticky bohatých sloučenin (triacylglycerolů a glykogenu) v játrech. V souladu s předpokladem podávání vysokotukové diety vedlo ke zvýšení obsahu triacylglycerolů v játrech. Významné snížení inzulinem stimulované glykogeneze u zvířat na vysokotukové dietě poukazuje na rozvoj inzulinové rezistence.

	standartní dieta		vysokotuková dieta	
	lačné	syté +I	lačné	syté+I
triacylglyceroly (μmol/g)	4,4 ± 1	3,5 ± 0,2	25,1 ± 4,2	29,8 ± 1,7 [#]
glykogen (μmol/g)	38 ± 2,5	259 ± 54,5 ⁺	27 ± 6,7	125 ± 7,9 ^{#,+}

Tabulka 4: Vliv vysokotukové diety na obsah energetických zásob v játrech. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± SEM, n = 5-7; [#] p < 0,05 syté VTD vs syté SD; ⁺ p < 0,05 syté vs lačné

5.3 Aktivita jaterních lipáz v jaterním homogenátu

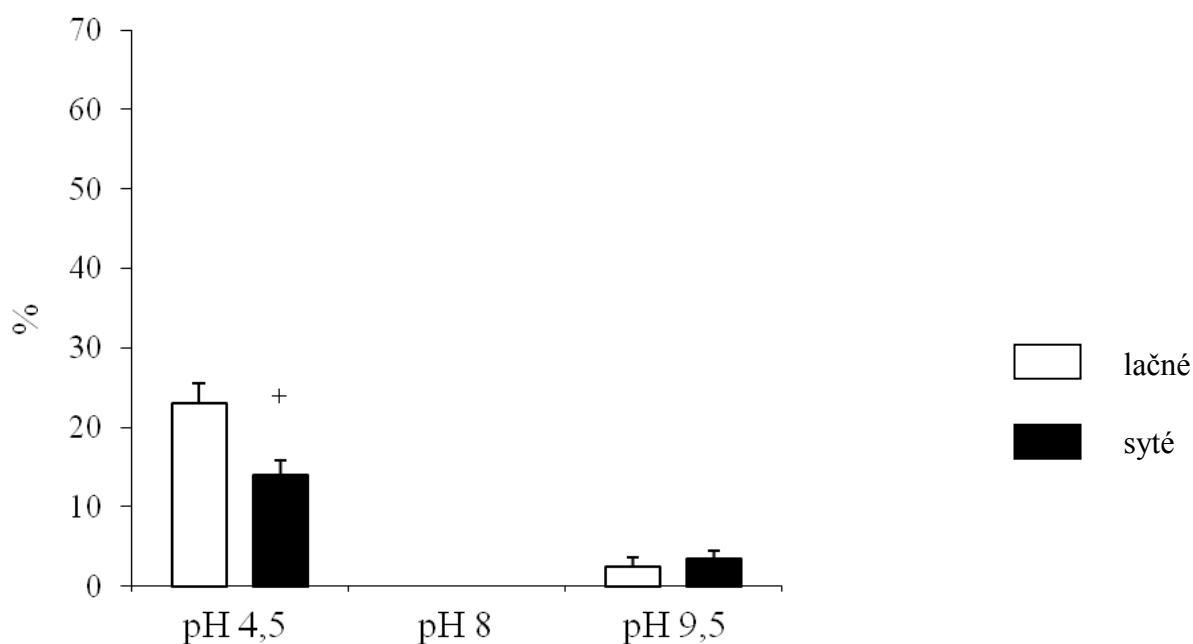
Cílem měření celkové lipolytické aktivity v homogenátu při různých hodnotách pH bylo určit relativní příspěvek jednotlivých lipáz k celkové degradaci lipidů v játrech. Měření provedená na exogenním substrátu, což je emulgovaný radioaktivně značený triolein, vypovídají o maximální kapacitě jednotlivých lipáz. Za tohoto experimentálního uspořádání byla nejvyšší lipolytická aktivita (40 - 60 % z celkové aktivity) naměřena při pH 4,5. Nižší aktivita byla sledována při pH 9,5 a odpovídala asi 40 – 50 % z celkové lipolytické aktivity. Při neutrálním pH bylo degradováno asi jen 10 % z celkového množství lipidů (Obr. 5).



Obr. 5: Celková aktivita jaterních lipáz na exogenním substrátu. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr \pm SEM; $n = 5$, $^+p < 0,05$ syté vs lačné

Afinita jednotlivých lipáz k uměle připravenému a přirozenému substrátu může být různá a rovněž dostupnost tohoto substrátu se může lišit. Proto jsme stanovili lipolytickou aktivitu v samotném homogenátu při zvolených hodnotách pH (4,5; 8; 9,5). Při použití endogenních triacylglycerolů jako jediného zdroje substrátu jsme získali rozdílné výsledky ve srovnání se stanovením lipolytické aktivity na exogenním substrátu. Za tohoto

experimentálního uspořádání byla nejvyšší aktivita stanovena při pH 4,5 a odpovídala asi 15 – 25 % většině celkové lipolytické aktivity. Velmi nízká aktivita byla naměřena při pH 9,5 a při neutrálním pH nedocházelo k uvolňování mastných kyselin (Obr. 6). Výsledky naznačují, že hlavním lipolytickým enzymem v játrech je kyselá lysozomální lipáza.



Obr. 6: Aktivita lipolytických enzymů na endogenním substrátu. Výsledky jsou hodnoceny jako aritmetický průměr \pm SEM; $n = 5$, $^+ p < 0,05$ syté vs lačné

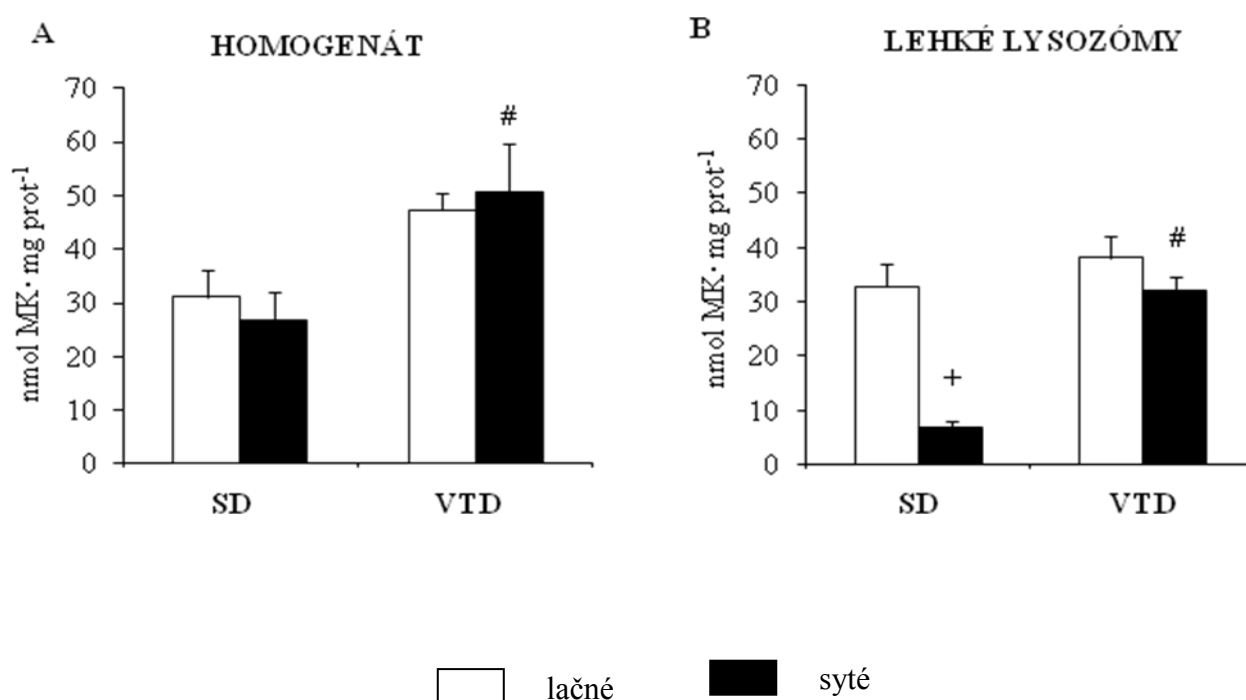
5.4 Identifikace aktivní frakce lysozómů

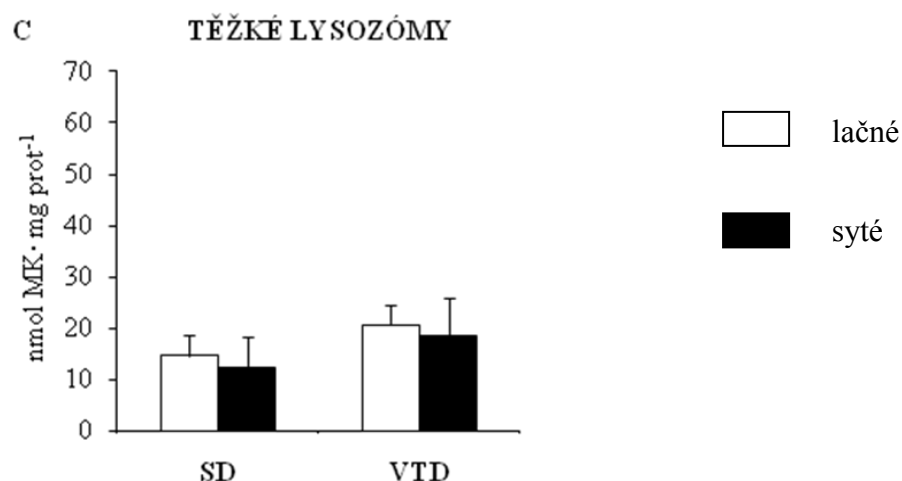
Celková aktivita lysozomálních enzymů stanovených *in vitro* nemusí být dostatečnou informací vypovídající o jejich skutečné aktivitě *in vivo*. V buňce se nacházejí dva typy lysozómů: pasivní a aktivní. Pasivní lysozomy jsou plně vybaveny kyselou hydrolázou a pravděpodobně i kyselým pH, ale neobsahují substrát pro degradaci. Aktivní lysozomy naproti tomu substrát, který podléhá degradaci, obsahují. Na základě údajů Seglena

a Solheimové jsme jako kritérium odlišující populace aktivních a pasivních lysozomů zvolili rozdílnou hustotu těchto komponent. Jaterní homogenát jsme centrifugací při 10 000 g rozdělili na lehkou flotující frakci (aktivní lysozomy) a těžkou sedimentovou frakci (pasivní lysozomy) (Seglen P. O., 1985).

5.4.1 Aktivita kyselé lysozomální lipázy na endogenním substrátu v subcelulárních frakcích

V takto připravených vzorcích jsme sledovali vliv hladovění na distribuci aktivity lysozomální lipázy v endogenním a exogenním substrátu. Podávání vysokotukové diety se projevilo zvýšenou aktivitou kyselé lysozomální lipázy u sytých zvířat (Obr. 7). Na rozdíl od exogenního ^3H - značeného trioleinového substrátu, představovala aktivita kyselé lysozomální lipázy ve frakci lehkých lysozomů u lačných zvířat většinu z celkové aktivity.

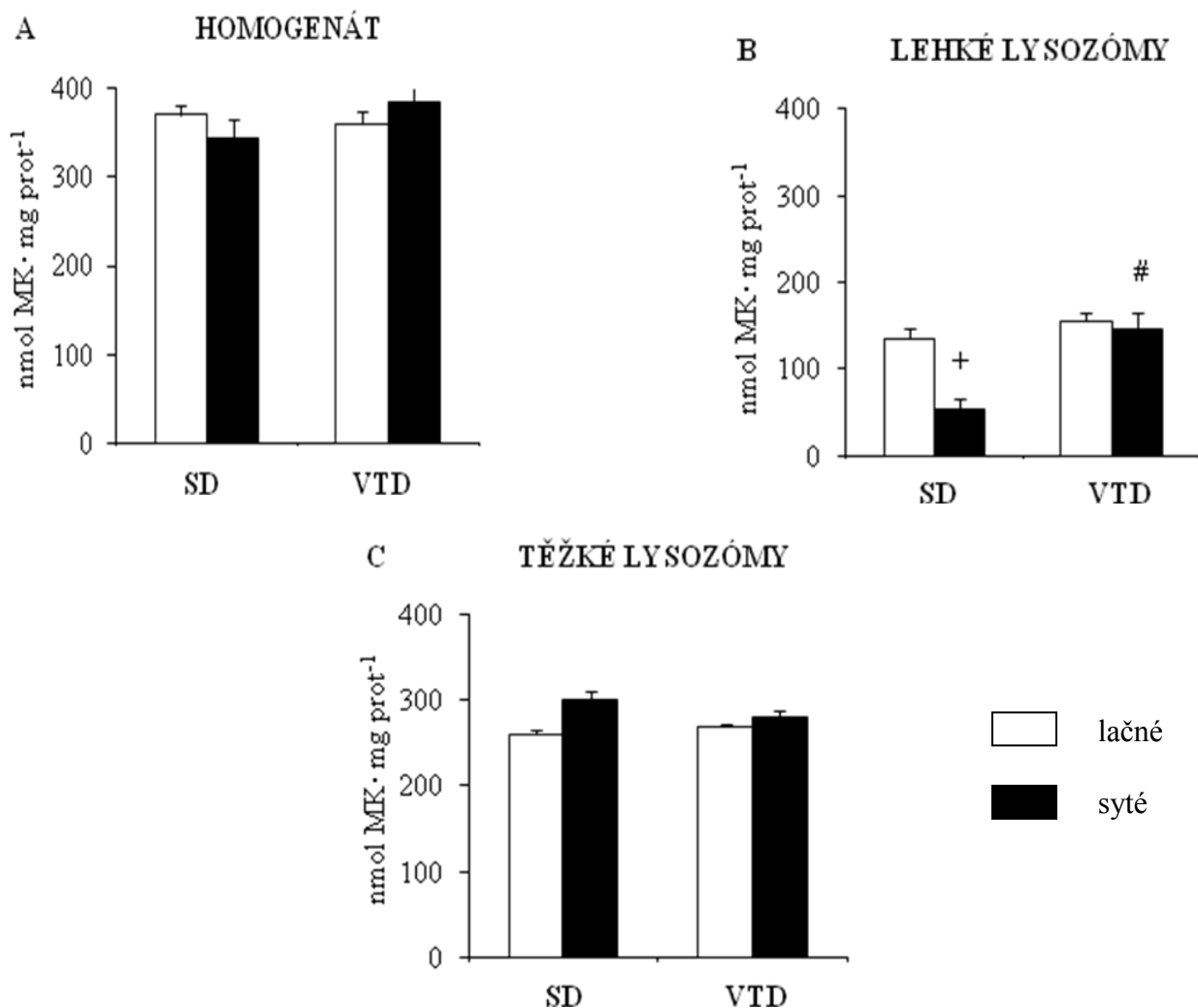




Obr. 7: Vliv vysokotukové diety na aktivitu kyselé lysozomální lipázy na endogenním substrátu. A: homogenát; B: lehké lysozomy; C: těžké lysozomy; ⁺p < 0,05 syté vs lačné; [#]p < 0,05 syté VTD vs syté SD

5.4.2 Aktivita kyselé lysozomální lipázy na exogenním substrátu v subcelulárních frakcích

Aktivita kyselé lysozomální lipázy na exogenním substrátu byla měřena jako uvolňování volných mastných kyselin při pH 4,5 z ³H- trioleinu (Obr. 8). V homogenátu a frakci těžkých lysozomů nebyla aktivita LAL ovlivněna podáváním vysokotukové diety a ani skutečností, zda bylo zvíře syté nebo lačné. Vliv hladovění na aktivitu LAL jsme prokázali pouze ve frakci lehkých lysozomů. U potkanů na standardní dietě byla v této frakci aktivita významně vyšší u lačných potkanů než u sytých. Podávání vysokotukové diety vedlo k významnému zvýšení aktivity kyselé lysozomální lipázy u sytých zvířat. Při měření na exogenním substrátu byla aktivita ve frakci lehkých lysozomů významně nižší než ve frakci těžkých lysozomů.

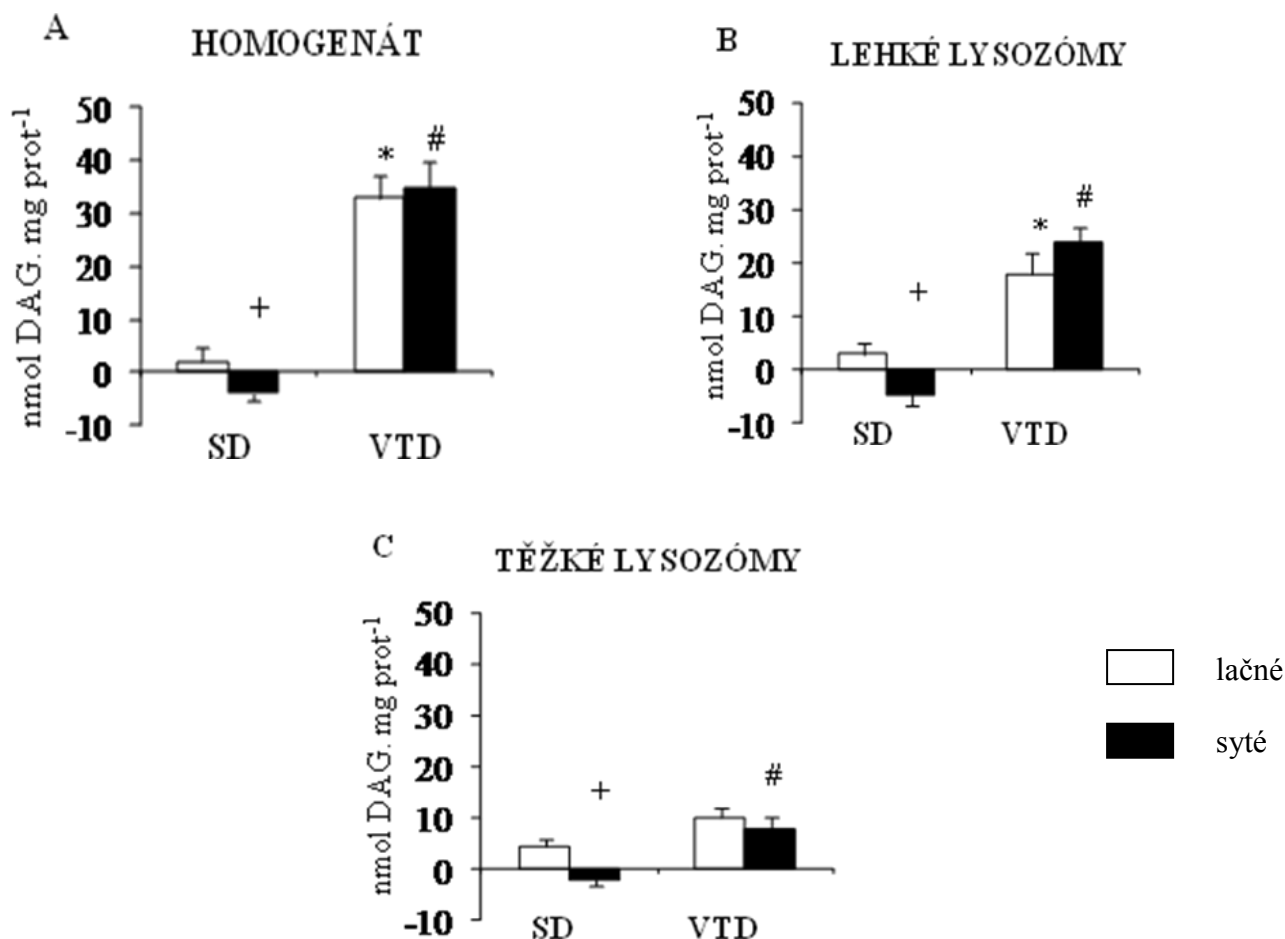


Obr. 8: Vliv vysokotukové diety na aktivitu kyselých lysozomálních lipáz na exogenním substrátu. A: homogenát; B: lehké lysozomy; C: těžké lysozomy; ⁺p < 0,05 syté vs lačné; [#]p < 0,05 syté VTD vs syté SD

5.4.3 Produkce diacylglycerolu v inkubovaných frakcích

Aktivitu kyselých lysozomálních lipáz na endogenním substrátu jsme sledovali i podle produkce diacylglycerolu, který je produktem štěpení triacylglycerolů kyselou lysozomální lipázou. Výsledky jsou uvedeny na obr. 9. Produkce diacylglycerolu u potkanů, kterým byla podávána standardní dieta, je velmi nízká, pravděpodobně na hranici citlivosti použité

metody. Podávání vysokotukové diety jednoznačně zvýšilo produkci diacylglycerolu ve všech testovaných frakcích.

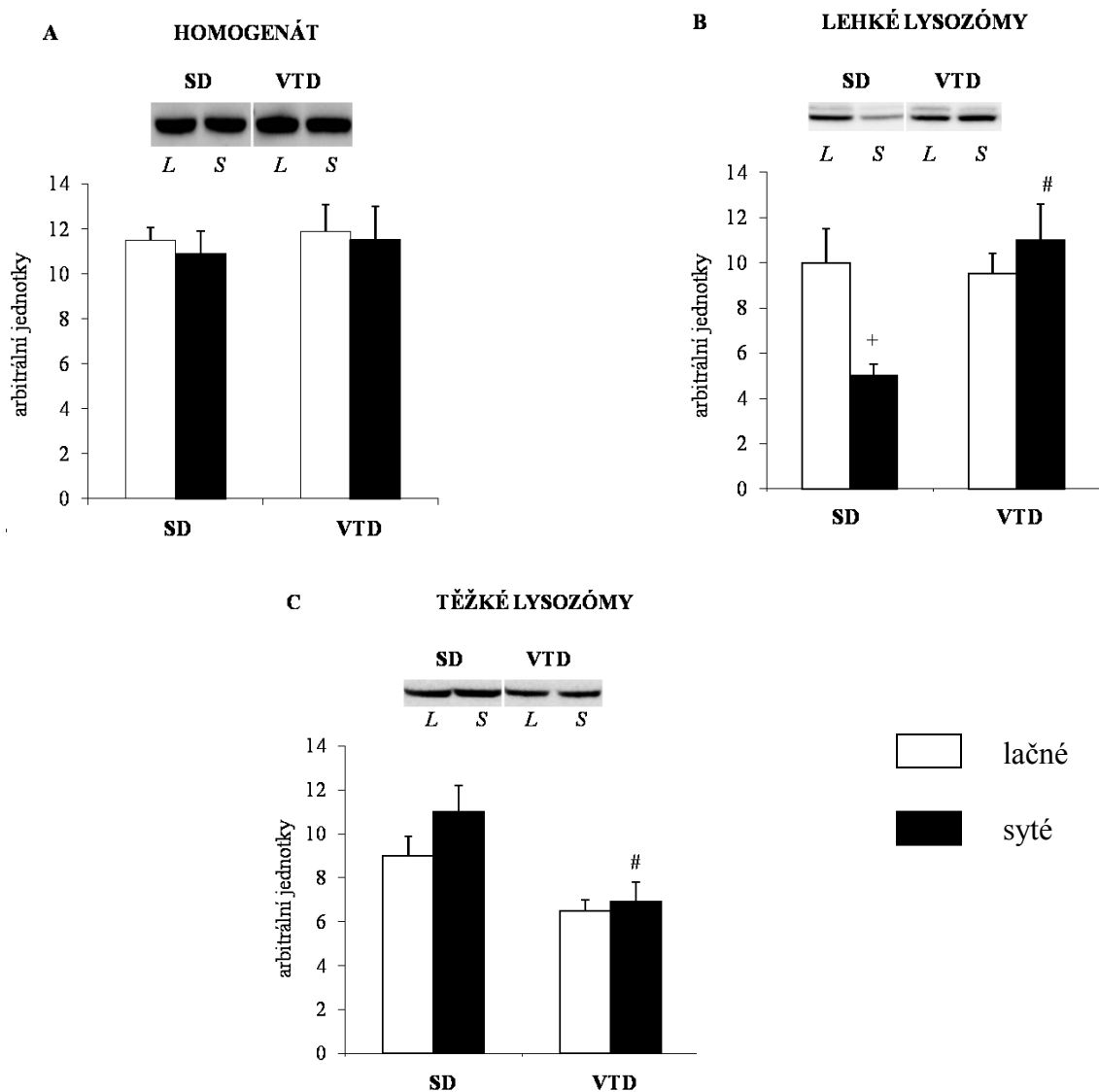


Obr. 9: Vliv vysokotukové diety na produkci diacylglycerolu. A: homogenát; B: lehké lysozomy; C: těžké lysozomy; ⁺p < 0,05 syté vs lačné; ^{*}p < 0,05 lačné VTD vs lačné SD; [#]p < 0,05 syté VTD vs syté SD

5.5 Přítomnost proteinu kyselý lysozomální lipázy ve frakcích

Předpoklad, že změny v aktivitě kyselý lysozomální lipázy jsou důsledkem translokace enzymu mezi frakcemi jsme dále ověřili sledováním výskytu LAL proteinu v jednotlivých frakcích. V souladu s výchozím předpokladem jsme neprokázali žádné

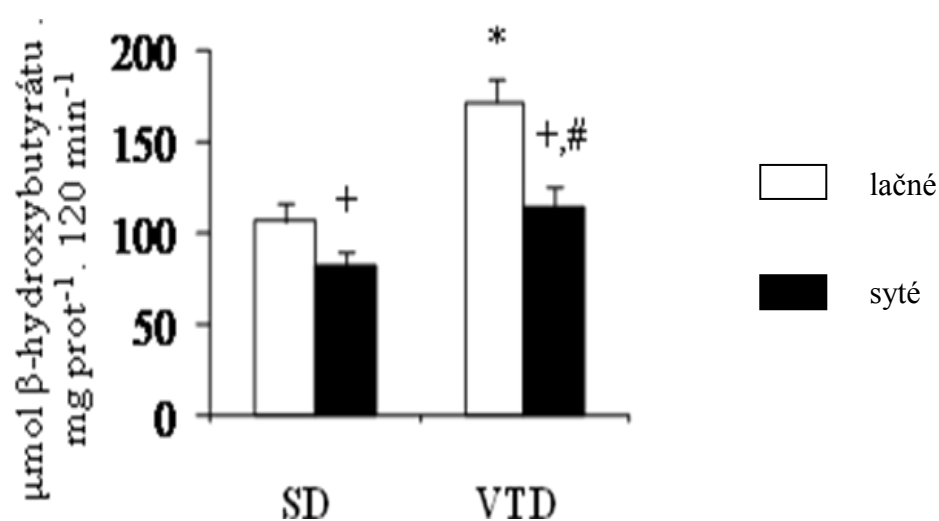
změny v celkové expresi LAL proteinu v homogenátu. Expresi LAL proteinu ve frakcích lehkých a těžkých lysozomů odpovídá změnám sledovaného enzymu. Ve frakcích lehkých lysozomů jsme zjistili nižší množství LAL proteinu v sytém stavu a vyšší expresi u lačných potkanů. Podávání vysokotukové diety vedlo k vymizení rozdílů závislých na hladovění a ke zvýšení obsahu LAL proteinu ve frakci lehkých lysozomů v sytém stavu. Množství proteinu kyselé lysozomální lipázy v jednotlivých frakcích bylo stanoveno pomocí elektroforézy. Změny ve výsledném množství tohoto proteinu korespondovaly se změnami v aktivitě kyselé lysozomální lipázy na standardní dietě. U zvířat na vysokotukové dietě mělo množství proteinu ve frakcích opačný průběh ve srovnání s aktivitou kyselé lysozomální lipázy (Obr. 10).



Obr. 10: Obsah LAL proteinu ve frakcích. A: homogenát; B: lehké lysozomy; C: těžké lysozomy; ⁺p < 0,05 syté vs lačné; [#]p < 0,05 syté VTD vs syté SD

5.6 Vliv vysokotukové diety na ketogenezi v jaterních řízcích *in vitro*

Nepřímým indikátorem degradace jaterních triacylglycerolů je tvorba ketolátek, které vznikají z mastných kyselin v hepatocytech v nepřítomnosti exogenních mastných kyselin. Hlavním zdrojem mastných kyselin pro jejich syntézu jsou intracelulární triacylglyceroly, které musí být nejprve štěpeny jaterní lipázou. V souladu s předpokladem jsme prokázali stimulační vliv vysokotukové diety na tvorbu ketolátek *in vitro* u lačných i sytých zvířat (Obr. 11).

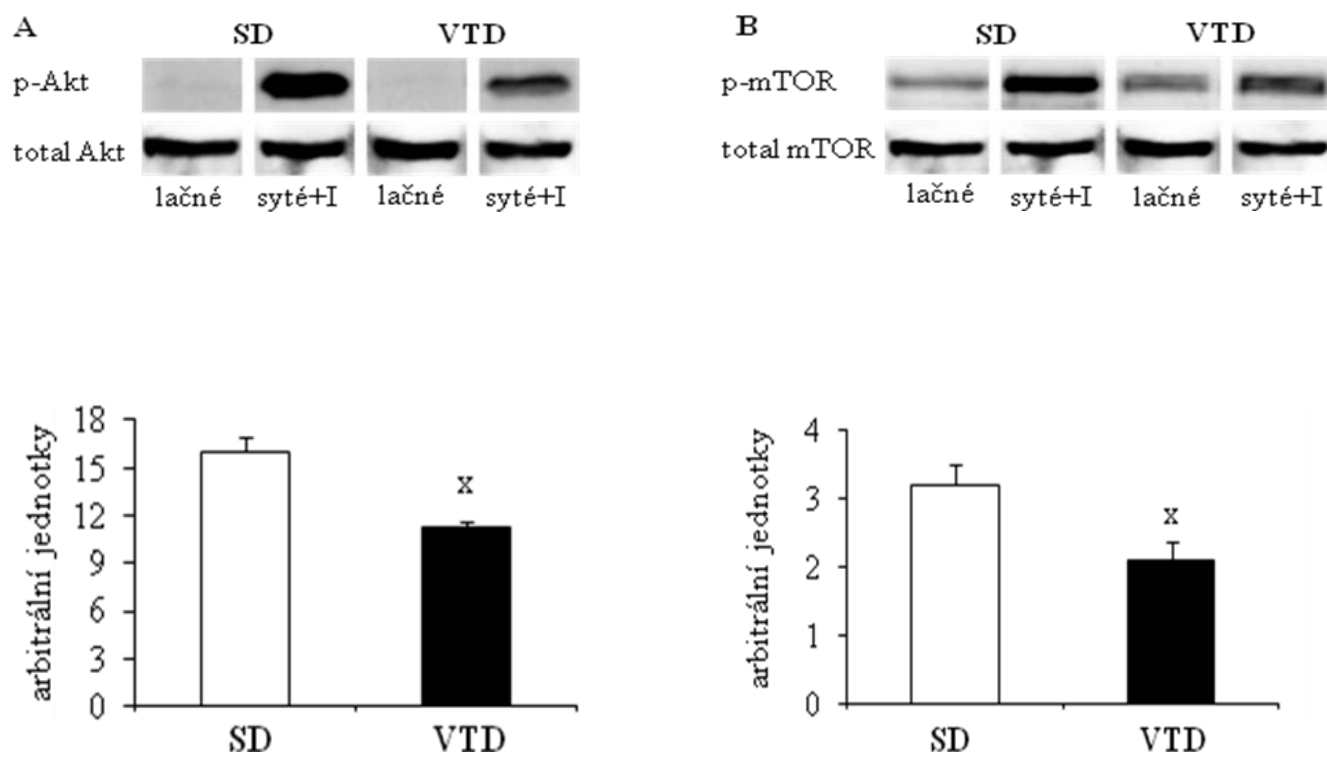


Obr. 11: Vliv vysokotukové diety na množství ketolátek v jaterních řízcích. ⁺p < 0,05 syté vs lačné; [#]p < 0,05 syté VTD vs syté SD; *p < lačné VTD vs lačné SD

5.7 Vliv vysokotukové diety na inzulinovou rezistenci

Přítomnost inzulinové rezistence při podávání vysokotukové diety jsme u našeho modelu prokázali na základě zvýšené lačné glykémie, zvýšené inzulinémie a pomocí orálního glukózového tolerančního testu. Tuto skutečnost jsme potvrdili i na molekulární úrovni, kde jsme pozorovali sníženou míru inzulinem stimulované fosforylace přenašečů inzulinové signální kaskády. Obr. 12A ukazuje oslabení vlivu inzulinu na fosforylaci Akt

kinázy ve skupině VTD. Podobné výsledky jsme prokázali i u mTOR kinázy (Obr.12B), což naznačuje zhoršení inzulinové signální transdukce.

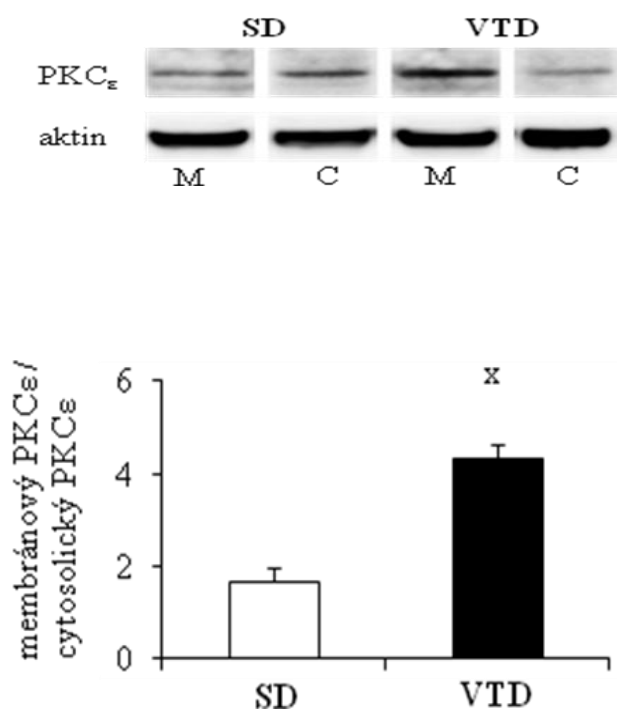


Obr. 12: Vliv akumulace tuku v játrech na inzulinem stimulovanou fosforylaci. A: fosforylace Akt kinázy (Ser473); B: fosforylace mTOR kinázy (Ser2448); ^xp < 0,05 VTD vs SD. Výsledky jsou vyjádřeny jako změny stimulovaného stavu vztaženého ke stavu základnímu.

5.8 Vliv vysokotukové diety na aktivaci PKCε

Nedávné studie prokázaly klíčovou úlohu PKCε v rozvoji inzulinové rezistence indukované tukovou dietou. Aktivovaná forma PKCε je asociovaná s membránou, zatímco neaktivní forma enzymu se nachází v cytosolu. K určení míry aktivace PKCε byly stanoveny rozdíly v množství v membráně vázané a cytosolické formy tohoto enzymu. Jak ukazuje obr. 13, ve skupině, která byla krmena vysokotukovou dietou, jsme prokázali signifikantně vyšší

obsah PKC ϵ ve frakci celkových membrán, což ukazuje na zvýšenou aktivaci tohoto enzymu.



Obr. 13: Vliv vysokotukové diety na aktivaci PKC ϵ . Znázorněný Western blot ukazuje frakce celkových membrán (M) a cytosolu (C); ^xp < 0,05 VTD vs SD

6 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo určit roli tří jaterních lipáz v degradaci intracelulárních triacylglycerolů a v rozvoji jaterní inzulínové rezistence v závislosti na různých fyziologických stavech (lačná a sytá zvířata) a na podávání standardní a vysokotukové diety. Výsledky ukázaly, že významným enzymem zodpovědným za štěpení endogenních triacylglycerolů je kyselá lysozomální lipáza. Prokázali jsme vliv vysokotukové diety na změny v intracelulární distribuci enzymu, což by mohlo být spojeno s vyšší aktivitou tohoto enzymu. Zvýšené štěpení triacylglycerolů při jaterní steatóze je spojeno s vyšší produkcí diacylglycerolu a mastných kyselin. Ve steatózních játrech jsme pozorovali zvýšenou aktivitu PKC ϵ a snížení vlivu inzulínu na fosforylaci a tím na aktivaci přenašečů inzulínové signální kaskády - Akt kinázy a mTOR kinázy. Naše výsledky naznačují, že zvýšení aktivity kyselé lysozomální lipázy po podávání vysokotukové diety a následná nadměrná produkce diacylglycerolu může přispívat k rozvoji inzulínové rezistence při jaterní steatóze prostřednictvím aktivace PKC ϵ .

V játrech jsou přítomny čtyři lipolytické enzymy: hepatická lipáza, adipocytární triacylglycerolová lipáza, triacylglycerolhydroláza a kyselá lysozomální lipáza. Hepatická lipáza je extracelulární enzym vázaný na povrchu hepatocytů a na sinusoidálních epitelálních buňkách. Jeho hlavní funkcí je odbourávání lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly a degradace HDL-lipoproteinů *in vitro*. Vzhledem k lokalizaci této lipázy je její hlavní účast při štěpení intracelulárních lipidů nepravděpodobná. Hepatickou lipázu lze z povrchu hepatocytů uvolnit heparinem (Thomas J., 1978). Debber prokázal, že po desetiminutové perfuzi jater heparinem nebylo možné při pH 9,5, tedy v oblasti pH optima hepatické lipázy, v homogenátu detegovat žádnou lipolytickou aktivitu (Debber L. C., 1979). Minimální intracelulární lipolytickou aktivitu potvrzují i naše výsledky. Ačkoli při měření na emulgovaném ^3H -triloleinu (definovaná na základě pH optima) byl tento enzym zodpovědný zhruba za 40 – 50 % z celkové lipolytické aktivity homogenátu, při použití intracelulárních triacylglycerolů jako substrátu jsme u stejného vzorku stanovili při hodnotě pH 9,5 minimální štěpení substrátu. Tento rozpor není v našem experimentálním uspořádání dán rozdílným množstvím hepatické lipázy, ale předpokládáme, že rozdíly v lipolytické

aktivitě na ^3H -trioleinu a intracelulárních triacylglycerolech jsou dány dostupností substrátu pro hepatickou lipázu.

Adipocytární triacylglycerolová lipáza se účastní hydrolýzy triacylglycerolů. Je exprimována nejvíce v bílé tukové tkáni, hnědé tukové tkáni, kosterním a srdečním svalu. Exprese v játrech je poměrně nízká. U ATGH- knockout myši došlo k rozvoji jaterní steatózy (Haemmerle G., 2006). Zvýšení exprese ATGH způsobilo zvýšení mobilizace lipidů a rozpad jaterních triacylglycerolů (Reid B. N., 2008). Naproti tomu všechny známé studie potvrdily, že přirozená exprese ATGL v játrech je nízká a to asi 10 % zatímco v bílé tukové tkáni je asi 25 %. Vzhledem k tomu není pravděpodobné, že ATGL hraje v játrech na rozdíl od tukové tkáně rozhodující úlohu při štěpení intracelulárních triacylglycerolů.

Triacylglycerolhydroláza je lokalizována v endoplazmatickém retikulu. Tento enzym má za podmínek *in vitro* vysokou specifitu ke krátkým rozpustným triacylglycerolům a nízkou specifitu k nerozpustným triacylglycerolům obsahujícím dlouhé řetězce mastných kyselin. Navzdory tomuto pozorování existuje řada studií, které potvrzují její význam v intracelulárním metabolismu lipidů a to především v sekreci VLDL (Lehner R., 1997) Wei na modelu TGH knockout myši (TGH^{-/-}) pozoroval snížení hladiny triacylglycerolů v séru, apolipoproteinu B a hladiny volných mastných kyselin jak u sytých, tak u lačných myši. Přestože došlo ke snížení sekrece VLDL, nedošlo ke snížení obsahu triacylglycerolů v játrech. U těchto knockout myši byl zvýšený příjem potravy, respirační koeficient a energetický výdej, aniž by se změnila tělesná hmotnost. Tyto metabolické změny byly doprovázeny zlepšením inzulínové senzitivity a glukózové tolerance. U těchto myši dále došlo k normalizaci glukózou stimulované sekrece inzulínu (Wei E., 2010). Toto potvrdil i Gibbons, který sledoval, že při nedostatku tohoto enzymu jsou nedostatečně mobilizovány zásobní triacylglyceroly pro VLDL sekreci (Gibbons D., 1994). Naše negativní výsledky, tedy téměř nulová lipolytická aktivita při pH 8, mohou rovněž souviset s lokalizací a funkcí tohoto enzymu. Lze předpokládat, že TGH vyžaduje specifickou interakci s dalšími proteiny v endoplazmatickém retikulu, které během našeho experimentu nebylo docíleno.

Ve starší literatuře můžeme najít několik dokladů, které podporují úlohu kyselé lysozomální lipázy v degradaci intracelulárních triacylglycerolů. Debber prokázal, že po odstranění hepatické lipázy heparinem je nejvyšší lipolytická aktivita v játrech při pH 4,4. Lysomotropní látky, které zvyšují pH v lysozomech (chloroquin, amoniak a metylamin),

částečně inhibovaly oxidaci endogenních mastných kyselin v izolovaných hepatocytech sytých potkanů. Hepatocyty byly nejprve inkubovány se značným oleátem, který označil triacylglyceroly, a poté v nepřítomnosti oleátu. Množství radioaktivity uniklé z triacylglycerolů bylo identické s množstvím radioaktivity navázané na oxid uhličitý a produkty oxidace mastných kyselin. Tyto výsledky naznačují, že oxidace endogenních mastných kyselin je znakem lipolýzy (Debber L. C., 1979). Du na modelu LAL-knockout ($lal^{-/-}$) myši prokázal roli kyselé lysozomální lipázy v degradaci intracelulárních triacylglycerolů. Absence tohoto enzymu způsobila signifikantní změny v mobilizaci mastných kyselin, v diferenciaci adipocytů, v inzulinové senzitivitě a v přesunu lipidových zásob z hepatocytu do Kupferových buněk. Tyto změny měly vliv na tělesný energetický metabolismus a ukázaly, že jaterní makrofágy se přímo účastní celkového cholesterolového a triacylglycerolového metabolismu (Du H., 2001).

Významnou roli kyselé lysozomální lipázy při štěpení intracelulárních triacylglycerolů naznačují i naše výsledky. Pouze kyselá lysozomální lipáza byla schopna štěpit jak ^3H -triolein, tak intracelulární triacylglyceroly. Právě při štěpení intracelulárních triacylglycerolů byl příspěvek tohoto enzymu dominantní a to asi 25 %.

Kyselá lysozomální lipáza je lokalizovaná v lysozomu a je aktivní pouze při kyselém pH, kterého ovšem není dosaženo v cytoplasmě, kde se nacházejí triacylglyceroly v podobě lipidových kapének. Možné řešení tohoto problému ve své práci navrhl Singh. Na základě podobnosti regulace autofagie a lipolýzy navrhli a prokázali hypotézu, podle které jsou lipidové kapénky pohlcovány autofagozomem a do lysozomu se jsou dopravovány standardní autofagickou dráhou. Inhibice autofagie (geneticky nebo farmakologicky podmíněná) zvyšuje obsah intracelulárních triacylglycerolů a lipidových kapének a snižuje degradaci triacylglycerolů (Singh R., 2009). Věříme, že naše výsledky jsou v souladu tímto tvrzením.

Naše výsledky rovněž ukazují na to, že translokace substrátu a enzymu hraje rozhodující roli v regulaci aktivity kyselé lysozomální lipázy. V našich experimentech jsme nepozorovali vliv hladovění ani diety na celkovou aktivitu kyselé lysozomální lipázy, kterou jsme stanovovali v homogenátu. Interpretaci těchto výsledků však komplikuje skutečnost, že lysozomy tvoří mimořádně heterogenní populaci, ve které je obtížné rozlišit, zda jsou lysozomy v aktivním stavu, tedy v kontaktu se substrátem, nebo v neaktivním stavu.

K aktivaci lysozomu dochází po fúzi s endozomem nebo autofagozomem, který nese materiál určený pro degradaci. Po hydrolýze obsahu jsou však uvolněné intermediáty transportovány do cytoplazmy a lysozom je připraven k fúzi. Bohužel, neexistuje žádný spolehlivý membránový marker, který by od sebe jednoznačně odlišil jednotlivé populace. My jsme navrhli postup založený na rozdílné hustotě lysozomů obsahující materiál k degradaci a neaktivních lysozomů navržený podle Solheimové. Tito autoři inkubovali izolované hepatocyty v médiu bez aminových kyselin, ve kterém mělo dojít k maximální autofagii a tedy ke změně v rozložení denzity lysozomů na kontinuálním metrizamidovém gradientu. Během této inkubace také identifikovali dva membránové markery, které pomáhají v rozlišení těžkých a lehkých lysozomů. Pokles lysozomální denzity byl doprovázen posunem kyselé fosfatázy do lehčí oblasti gradientu. Druhý lysozomální marker hexosaminidáza kopíroval denzní posun kyselé fosfatázy (Seglen P. O., 1985).

Na základě těchto pozorování jsme jaterní homogenát pomocí diferenciální centrifugace rozdělili na lehkou lysozomální frakci, která při 10 000g zůstává v supernatantu, a na těžkou lysozomální frakci, která sedimentuje. Literární údaje (Lysosome Isolation kit Sigma-Aldrich St. Louis USA) udávají, že veškeré lysozomy sedimentují při 20 000g. My jsme vycházeli z předpokladu, že aktivní lysozomy obsahují triacylglyceroly a jsou tedy lehčí. Hladovění indukuje jaterní autofagii a zvyšuje přísun mastných kyselin z tuku do jater. Tento předpoklad jsme ověřili v experimentu, kdy jsme sledovali vliv hladovění na aktivitu kyselé lysozomální lipázy v lehké a těžké frakci lysozomů. Na endogenním substrátu představovala aktivita kyselé lysozomální lipázy ve frakci lehkých lysozomů u lačných zvířat většinu z celkové aktivity. V homogenátu a frakci těžkých lysozomů nebyla aktivita LAL stanovená na endogenním substrátu ovlivněna podáváním vysokotukové diety a ani skutečností, zda bylo zvíře syté nebo lačné. Vliv hladovění na aktivitu LAL jsme prokázali pouze ve frakci lehkých lysozomů. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že aktivované lysozomy se nachází ve frakci lehkých lysozomů a aktivita kyselé lysozomální lipázy stanovená v této frakci představuje i fyziologicky aktivní část tohoto enzymu *in vivo*.

Nedávno publikované výsledky Samuelse přinesly přesvědčivé důkazy o zásadní úloze PKCε v rozvoji jaterní inzulinové rezistence indukované podáváním vysokotukové diety. Již třídní podávání vysokotukové diety vedlo k akumulaci tuku v játrech a rozvoji

inzulínové rezistence bez signifikantního hromadění tuku v periferních tkáních nebo inzulínové rezistence v těchto tkáních. Při rozvoji jaterní inzulínové rezistence indukované podáváním vysokotukové diety došlo k aktivaci PKC ϵ a/nebo JNK1, které mohly dále poškodit fosforylaci IRS-1 nebo IRS-2. Tento blok v inzulínové signální dráze poté omezil schopnost inzulínu aktivovat glykogensyntázu, která se účastní produkce glukózy z jater (Samuel V. L., 2004). Publikované práce se však nezabývaly signálem, který vede k aktivaci PKC ϵ za daných fyziologických podmínek. PKC ϵ je aktivovaná 1, 2-sn-diacylglycerolem, což je důležitá signální molekula (Neschen S., 2005). DAG vzniká v důsledku štěpení fosfolipidů fosfolipázou C, ale také je produktem štěpení triacylglycerolů kyselou lysozomální lipázou (Hayase K., 1970). Zvýšený obsah DAG v důsledku aktivace biosyntetické dráhy a následné aktivace PKC ϵ byl popsán ve svalu zvířat, kterým byla podávána vysokotuková dieta (Samuel V. L., 2004). DAG tedy vzniká i při degradaci triacylglycerolů a tato dráha, jak jsme prokázali, je v játrech velmi aktivní a je potencionována podáváním vysokotukové diety. Naše experimenty naznačují, že diacylglycerol, pocházející z nadměrného štěpení triacylglycerolů v důsledku zvýšené lipolytické aktivity kyselé lysozomální lipázy, vede k nadměrné aktivaci PKC ϵ ve steatózních játrech. Tato hypotéza je podpořena faktem, že kyselá lysozomální lipáza je ve steatózách jater specificky aktivovaná v sytém stavu a možný aktivátor PKC ϵ je v buňce přítomný i v situaci, kdy zároveň působí inzulín.

7 Závěr

V našem experimentu jsme prokázali, že podávání vysokotukové diety vede ke zvýšenému obsahu triacylglycerolů v játrech, které je asociováno se zvýšenou aktivitou kyselé lysozomální lipázy a ke zvýšené produkci diacylglycerolu a mastných kyselin. Kyselá lysozomální lipáza byla identifikovaná jako významný enzym zodpovědný za rozpad intracelulárních triacylglycerolů. Naše výsledky naznačují, že při jaterní steatóze může být aktivátorem PKC ϵ diacylglycerol pocházející z rozpadu triacylglycerolů v důsledku zvýšené aktivity kyselé lysozomální lipázy.

8 Seznam literatury

- Assmann G., Krauss R. M., Fredrickson D. S., Levy R. I. (1973) Characterization, subcellular localization, and partial purification of heparin-released triacylglycerole lipase from rat liver. *J Biol Chem* 248:1992-1999.
- Assmann G., Seedorf U. (1995) Acid lipase deficiency: Wohlman disease and cholesteryl ester storage. McGraw-Hill, New York.
- Berg T. O., Fengsrud M., Strømhaug P. E., Berg T., Seglen P. O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*. 273:21883-92.
- Debeer L. J., Thomas J., De Schepper P. J., Mannaerts G. P. (1979). Lysosomal triacylglycerol lipase and lipolysis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 254:8841-8846.
- Debeer L. J., Beynen A. C., Mannaerts G. P., Geelen M. J. H. (1982). Lipolysis of hepatic triacylglycerol stores. *FEBS Lett*. 140: 159-164.
- Diraison F., Moulin P., Beylot M. (2003) Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma onto esterified fatty acids to plasma triacylglycerole synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 29:478-485.
- Du H., Heur M., Duanmu M., Grabowski G. A., Hui D. Y., Witte P. W., Mishra J. (2001) Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span. *J Lipid Res* 42:489-500.
- Du H., Witte D. P., Grabowski G. A. (1996) Tissue and cellular specific expression of murine lysosomal acid lipase mRNA and protein. *J Lipid Res* 37:937-949.
- Eskelinen E. L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy* 1: 1-10.
- Fabbrini E., Mohammed B. S., Magkos F., Korenblat K. M., Patterson B. W., Klein S. (2008) Alteration in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134:424-431.
- Fabbrini E., Sullivan S., Klein S. (2010). Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implication. *Hepatology*, 51: 679-689.

- Fengsrud M., Roos N., Berg T., Liou W., Slot J. W., Seglen P. O. (1995) Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp Cell Res*, 221: 504-519.
- Fielding B. A., Frayn K. N. (1998) Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *Br J Nutr* 80:495-502.
- Fowler S. D., Brown W. J. (1984) In: *Lipases*. Elsevier, New York, pp. 329-364.
- Gavrilova O., Marcus-Samuels B., Graham D., Kim J. K., Schulman G. I., Castle A. L., Vinson C., Eckhaus M., Reitman M. L. (2000) Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105:271-278.
- Gibbons G. F., Bartlett S. M., Sparks C. E., Sparks J. D. (1992) Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 287:749-753.
- Gibbons G. F., Khurana R., Odwell A., Seelaender M. C. (1994) Lipid balance in HepG2 cells: active synthesis and impaired mobilization. *J Lipid Res* 35:1801-1808.
- Gordon P. B., Seglen P. O. (1988) Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 151:40-47.
- Greco D., Kotronen A., Westerbacka J., Puig O., Arkilla P., Kiviluoto T. et al. (2008) Gene expression on human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G1281-G1287.
- Haemmerle G., Lass R., Zimmermann G., Gorkiewicz G. et al. (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose tissue triacylglyceride lipase. *Science*, 312: 734-737.
- Hayase K., Tappel A. L. (1970) Specificity and other properties of lysosomal lipase of rat liver. *J Biol Chem*, 245:169-175.
- Holen I., Gordon P. B., Strømhaug P. E., Berg T. O., Fengsrud M., Brech A., Roos N., Berg T., Seglen P. O. (1995) Inhibition of asialoglycoprotein endocytosis and degradation in rat hepatocytes by protein phosphatase inhibitors. *Biochem J*, 311: 317-26.
- Hwang J. H., Stein D. T., Barzilai N., Cui M. H., Tonelli J., Kishore P., et al. (2007) Increased intrahepatic triacylglycerole is associated with peripheral insulin

- resistance:in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1663-E1669.
- Jenkins C. M., Muncuso D. J., Yan W., Sims H. F., Gibson B., Gross R. W. (2004) Identification, cloning, expression, and purification of free novel human calcium-independent phospholipase transacylase activities. *J Biol Chem* 279:48968-48975.
- Kohjima M., Enjoji M., Huguchi N., Katoh K., Yoshimo T., et al. (2007) Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 20:351-358.
- Korenblat K. M., Fabbrini E., Mohammed B. S., Klein S. (2008) Liver, muscle and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triacylglycerole content in obese subjects. *Gastroenterology* 134:1369-1375.
- Kraegen E. W., Clark P. W., Jenkons A. B., Daley E. A., Chisholm D. J., Storlier L. H. (1991) Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40:1397-1403.
- Lankester D. L., Brown A. M., Zammit V. A. (1998) Use of cytosolic triacylglycerol hydrolysis products and of exogenous fatty acid for the synthesis of triacylglycerol secreted by cultured rat hepatocytes. *J lipid Res* 39:1889-1895.
- Lehner R., Verger R. (1997) Purification and characterization of porcine liver microsomal triacylglycerol hydrolase. *Biochemistry* 36: 1861-1868
- Liou W., Geuze H. J., Geelen M. J., Slot J. W. (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol.*, 136: 61-70.
- Ludwig J., Viggiano T. R., McGill D. B., et al. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 55(7): 434-438.
- McGarry J. D., Foster D. W. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49:359-420.
- Molina J. M., Ciaraldi T. P., Brady D., Olefsky J. M., Holm C., Osterlund T., Laurell H., Contreras J. A. (1989). Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subject. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Insensitivity of large rat adipocytes to the antilipolytic effects of insulin. *Diabetes*, 38: 991-995.

- Musso G., Bambino R., Cassader M. (2009) Recent insights into hepatic metabolism in non-alcoholic fatty liver. *Progress in lipid research* 48:1-26.
- Nagle C. A., An J., Shiota M., Torres T. P., Cline G. W., Liu Z. W., et al. (2007) Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance 282:14807-14815.
- Nagle C. A., Klett E. L., Coleman R. A. (2009) Hepatic triglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res* 50:S74-S79.
- Neschen S., et al. (2005). Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metab*, 2: 55-65.
- Nielson S., Guo Z., Johnson C. M., Hensrud D. D., Jensen M. D. (2004) Splanchnic lipolysis on human obesity. *J Clin Invest* 113: 1582-1588.
- Olofsson S. O., Asp L., Boren J. (1999) The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 10: 341-346.
- Pardina E., Baena-Fustegueras J. A., Catalan R., Galard R., Lecute A., Fort J. M., et al. (2009) Increased expression and activity of hepatic lipase in the liver of morbidly obese adult patient in relation to lipid content. *Obes Surg* 19:894-904.
- Pfeifer U. (1978). Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy. *J Cell Biol*, 78:152-167.
- Powell E. E., Cooksley W. G., Hanson R., Searle J., Halliday J. W., Powell L. W. (1990). The natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology*, 11: 74-80.
- Reid B. N., Ables G. P., Otlivanchik O. A., Schoiswohl G., Zechner R., Blaner W. S., Goldberg W. S., Schwabe R. F., Chua S. C. Jr., Huang L. S. (2008) Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triacylglycerol lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem* 283:13087-13099.
- Riemens S. C., Sluiter S. C., Dullaart R. P. (2000) Enhance escape of non-esterified fatty acids from tissue uptake: its role in impaired insulin-induced lowering of total rate of appearance in obesity and type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 416-426.

- Samuel V. T., Liu Z. X., Qu X., Elder B. D., Bilz S., Befroy D., Romanelli A. J., Shulman G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279:32345-32353.
- Sando G. N., Henke V. L. (1982) Recognition and receptor-mediated endocytosis of the lysosomal acid lipase secreted by cultured human fibrocytes. *J Lipid Res* 23:114-123.
- Sanyal A. J. (2002). AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123:1705-25.
- Savage D. B., Murgatroyd P. R., Chatterjee V. K., O'Rahilly S. (2005). Energy expenditure and adaptive responses to an acute hypercaloric fat in humans with lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 1446-1452.
- Seglen P. O., Solheim A. E. (1985). Conversion of dense lysosomes into light lysosomes during hepatocytic autophagy. *Exp Cell Res* 157: 550-555.
- Shimomura I., Bashmakov Y., Horton J. D. (1999) Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274:30028-30032.
- Schulman G. I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176.
- Singh R., Kaushik S., Wang Y., Xiang Y., Novak I., Komatsu M., Tanaka K., et al. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458:1131-1135.
- Strømhaug P. E., Seglen P. O. (1993). Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochem J.*, 291: 115-121.
- Teng M. H., Kaplan A. (1974) Purification and properties of rat liver lysosomal lipase. *J Biol Chem* 249:1064-1070.
- Thomas J., Debber L. J., Mannaerts G. P. (1978). Complete loss of heparin-release triacylglycerol lipase activity after collagenase treatment of the rat liver. *Biochem J*, 172: 177-179.
- Tolleshaug H., Berg T., Frölich W., Norum K. R. (1979). Intracellular localization and degradation of asialofetuin in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.*, 585:71-84.
- Van den Berghe G. (2004) How does blood glucose control with insulin save lives in intensit care? *J Clin Invest* 114 (9): 1187-1195.

- Vojarova B., Stefan N., Lindsay R. S., et al. (2002). High alanine aminotransferase is associated with decrease hepatic insulin sensitivity and predicts the development of the type 2 diabetes. *Diabetes*, 51:1889-1895.
- Wanless I. R., Lentz J. S. (1990). Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity. An autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*, 12:1106-1110.
- Watt M. J. (2009) Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triacylglycerole protect skeletal muscle from insulin resistance? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:5-11.
- Wei E., Ben Alli Y., Lyon J., Wang H., Nelson R., Dolinsky V. W., Dyck J. R., et al (2010) Loss of the TGH/Ces3 in mice decrease blood lipids, improves glucose tolerance, and increase energy expenditure. *Cell Metab*, 11: 183-193.
- Wiggins D., Gibbons G. F. (1992) The lipolysis/esterification cycle of hepatic triglycerol. Its role in the secretion of very-low density lipoprotein and the response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J*: 284: 457-462.
- Yang L. Y., Kuksin A., Myher J. J., Steiner G. (1996) Contribution of de novo fatty acid synthesis to very low density lipoprotein triacylglycerol: evidence from mass isotopomer distribution analysis of fatty acids synthesized from [²H₆]ethanol. *J Lipid Res* 37:262-274.
- Yu X. X., Murray S. F., Pnadey S. K., Booten S. L., Bao D., Song X. Z., et al. (2005) Antisense oligonucleotide reduction of DGAT 2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice 42:362-371.
- Zhang D., Liu Z. X. Choi C. S., Tian L., Kibbey R., Dong J. et al. (2007) Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17075-17080.
- Zick Y. (2004) Molecular basis of insulin action. *Novartis Found Symp*, 262: 36-50, discussion p. 50-35, p. 265-268.